

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'acétylation de l'histone H4 chez Schizosaccharomyces pombe

DESSART , Valentine

Award date:
2014

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'ACÉTYLATION DE L'HISTONE H4 CHEZ
*SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Valentine DESSART

Janvier 2014

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'ACETYLATION DE L'HISTONE H4 CHEZ
*SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Valentine DESSART

Janvier 2014

Etude de l'acétylation de l'histone H4 chez *Schizosaccharomyces pombe*

DESSART Valentine

Résumé

Chez les eucaryotes, l'ADN génomique est empaqueté dans une structure complexe nommée chromatine. L'ADN s'enroule autour de protéines histones pour former une structure globulaire : le nucléosome. L'extrémité N-terminale des histones protrude de la structure et est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles dont l'acétylation qui joue un rôle dans tous les processus impliquant l'ADN.

Ce mémoire comporte deux objectifs : l'identification des HATs (Histone Acétyl Transférase) responsables de l'acétylation des lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 (H4) chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, et la création de mutants non-acétylables pour ces mêmes résidus, ces deux approches devant contribuer à établir la relevance biologique de l'acétylation de l'histone H4.

Notre travail a montré que l'inactivation individuelle des trois HATs connues chez *S. pombe*, à savoir les complexes NuA4, NuA3 et SAGA ne permet pas d'abolir l'acétylation de H4.

L'analyse de double et triple mutants suggère que SAGA et NuA4 sont impliquées de manière partiellement redondantes dans l'acétylation de H4 et révèle une co-létalité synthétique entre une sous-unité de NuA4 et Gcn5, la sous-unité catalytique de SAGA, ce qui suggère que l'acétylation de H4 pourrait être essentielle.

La construction de mutants non-acétylables a confirmé cette hypothèse. Particulièrement, le mutant K5-8-12R où les lysines à ces trois positions sont changées en arginine est non-viable.

L'utilisation de mutants semi-dominants suggère que l'absence d'acétylation résulte en un défaut, sans doute mitotique, au cours du cycle cellulaire.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

Promoteur: D. Hermand

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Damien Hermand de m'avoir accueillie dans son équipe, pour ses conseils qu'il m'a prodigués, ainsi que pour sa patience.

Je remercie également les membres du jury : Olivier De Backer, Xavier De Bolle, Catherine Lambert et Yves Poumay d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres de l'équipe GEMO, passés et présents, et tout particulièrement à Philippe Materne pour le travail effectué sur l'écrit de mon mémoire. Je remercie également Valérie Migeot, Clément Cassart et Julie Candiracci pour leur aide technique et leur discussion.

Également un grand merci à toutes les personnes de l'URBM.

Je remercie également mes amis mémorants d'en haut pour tous ces bons moments passés ensemble et nos « pauses » craquages. Merci à Clément Barbier, Jessica Charlot, Olivier Finet, Charlotte Hougardy, Katy Poncin, et Luca Rappez. Merci également à Alessandra Carion pour nos années de kot/appart ensemble ainsi que tout ces moments passés ensemble. A Lore Parissi, pour nos petites balades de début et nos discussion de courage sur facebook ainsi qu'à tous les autres étudiants de ma promotion.

Je remercie infiniment mes parents pour le travail de relecture de ce mémoire, mais également pour les nombreuses soirées à discuter de mes petites levures.

Enfin, merci à Simon pour son soutien ainsi que mes collègues du secondaire : Hélène, Aurélie, Sandrine, Marie, Frédérique, ...

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| I. ABREVIATIONS UTILISEES | 6 |
| II. INTRODUCTION | 7 |
| A. Le modèle d'étude : la levure de fission | 7 |
| B. La transcription chez les eucaryotes | 8 |
| C. Structure « des » chromatines | 9 |
| 1. Les effets « <i>cis</i> » : | 10 |
| 2. Les effets « <i>trans</i> » : | 10 |
| 3. Les effets de remplacements : | 10 |
| D. « Writers » and « Readers ». | 10 |
| E. Rôles de l'acétylation de la chromatine. | 11 |
| 1. Assemblage du nucléosome. | 11 |
| 2. Assemblage de la chromatine | 11 |
| 3. Acétylation et transcription | 12 |
| 4. Un code d'acétylation de l'histone H4 ? | 12 |
| F. Les différentes familles de HAT | 12 |
| 1. La famille MYST | 12 |
| a. NuA4 | 12 |
| b. NuA3 | 13 |
| 2. La famille GNAT | 13 |
| III. OBJECTIFS DU MEMOIRE | 14 |
| A. Identification des HAT de l'histone H4 chez <i>S. pombe</i> | 14 |
| B. Création de mutants non-acétylables pour l'histone H4 chez <i>S. pombe</i> | 14 |
| IV. RESULTATS | 15 |
| A. Dissection de tétrades (Figure 13) | 15 |
| B. « Randon Spore Analysis – RSA » | 16 |
| C. Identification des HAT de l'histone H4 chez <i>S. pombe</i>. | 16 |
| D. Etude de l'acétylation de l'histone H4 dans les mutants simples ou combinés de HAT. | 17 |
| E. Génération de mutants non acétylables de l'histone H4 | 18 |
| 1. Stratégie utilisée précédemment au laboratoire pour obtenir des mutants non acétylables de l'histone H3 | 19 |
| a. Mutant K5R (Tableau 2) | 19 |
| b. Mutant K5-8-12R (Tableau 3) | 19 |
| c. Mutants K5-8-12-16R (Tableau 4) | 20 |
| 2. Semi-dominance des allèles <i>h4.2 K5-8-12R</i> et <i>h4.2 K5-8-12-16R</i> | 20 |
| F. Etude de l'acétylation de l'histone H4 sur les résidus K5, K8, K12 et K16 avec des souches non-acétylables | 20 |

| | |
|--|-----------|
| V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 22 |
| VI. MATERIEL ET METHODES | 25 |
| A. Souches utilisées | 25 |
| B. Oligonucléotides | 25 |
| C. Milieux de culture | 26 |
| D. Croisements | 27 |
| 1. « Random Spore Analysis » | 27 |
| 2. Dissection de tétrades | 27 |
| E. Mise en évidence des protéines | 27 |
| 1. Extraction de protéines | 27 |
| 2. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant | 27 |
| 3. Transfert sur membrane de PVDF (Western Blot) | 27 |
| 4. Immunodétection | 27 |
| F. Transformation de <i>S. pombe</i> | 28 |
| G. PCR sur colonie | 28 |
| H. PCR « expand » | 28 |
| I. Electrophorèse sur gel d'agarose | 28 |
| J. Purification de produits PCR | 29 |
| VII. BIBLIOGRAPHIE | 30 |

ABBREVIATIONS UTILISEES

I. Abréviations utilisées

| Abréviations | Signification |
|--------------|---|
| AA | Acide Aminé |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| CDK | Kinase Cycline Dépendante |
| CTD | Domaine carboxy-terminal de la sous-unité Rpb1 de la polymérase II |
| DO | Densité Optique |
| ORF | Cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame) |
| pb | Paires de bases |
| Pol II | ARN polymérase ADN dépendante de type II |
| S | Sérine |
| S2 | Sérine en position 2 du domaine carboxy-terminal de la sous-unité Rpb1 de la polymérase II |
| S2A | Sérine en position 2 du domaine carboxy-terminal de la sous-unité Rpb1 de la polymérase II mutée en Alanine |
| S2P | Sérine en position 2 du domaine carboxy-terminal de la sous-unité Rpb1 de la polymérase II présentant une phosphorylation |
| TBP | TATA Binding Proteins |
| TF | Facteur de Transcription |
| WT | Wild Type |

INTRODUCTION

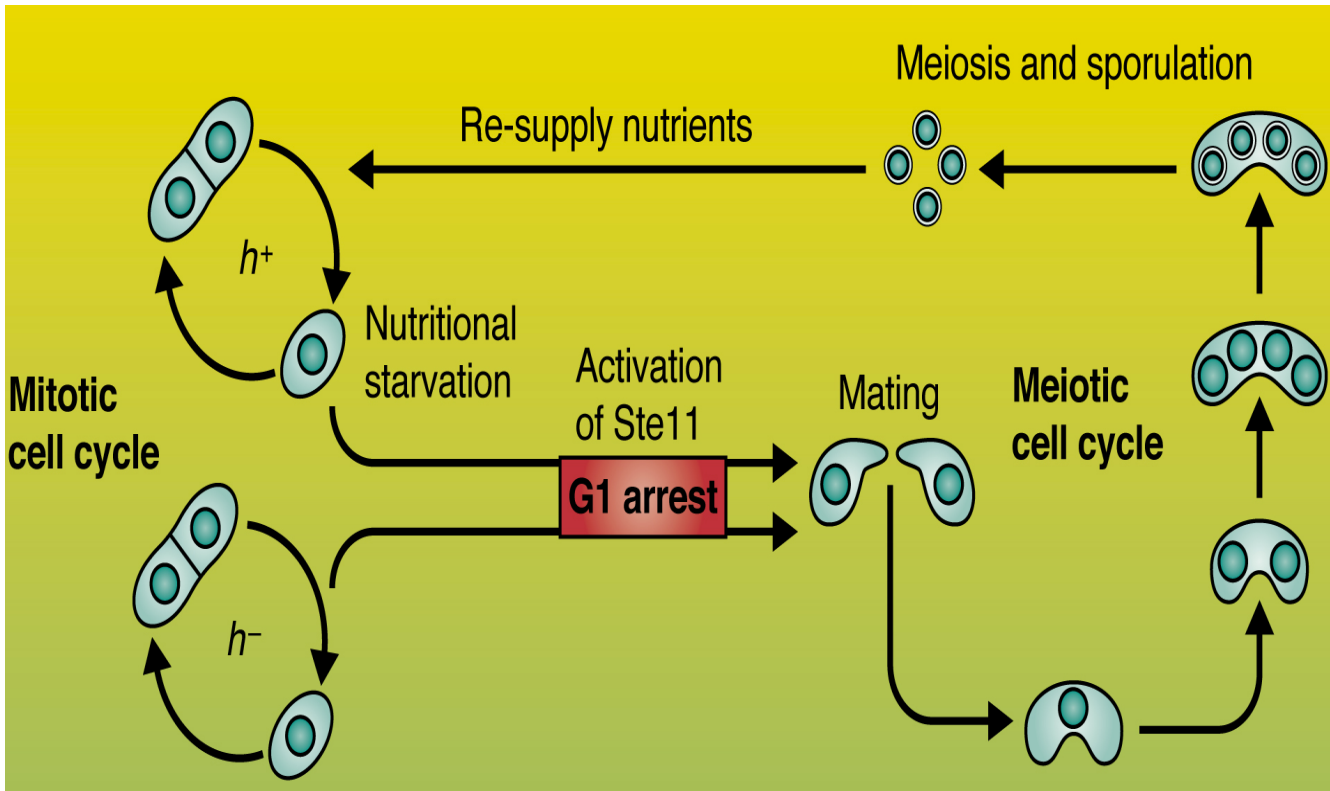


Figure 1 : Cycle cellulaire de *S. pombe*.

Dans des conditions favorables, *S. pombe* se divise par fission selon un cycle végétatif. Lors d'une carence nutritive, le cycle cellulaire s'arrête en phase G1 ce qui permet l'activation de Ste11. Ensuite, deux cellules haploïdes de mating types opposés vont fusionner pour former un zygote. La méiose est immédiatement déclenchée pour former quatre spores contenues dans une ascospore. Une fois que les conditions redeviennent favorables, les spores vont pouvoir germer et rentrer dans le cycle végétatif (d'après Otsubo *et al.*, 2012)

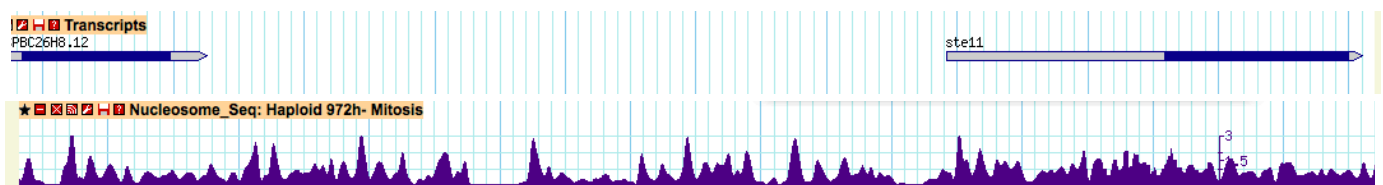


Figure 2 : Cartographie des nucléosomes pour le gène *ste11* chez *S. pombe* (Tiré de Soriano *et al.*, BMC genomics, 2013).

Les régions localisées au niveau des promoteurs sont dépourvues de nucléosomes (NDR)

II. Introduction

Avant-propos :

L'empaquetage du matériel génétique dans une structure complexe, la chromatine, est une caractéristique distinctive des cellules eucaryotes. Les protéines histones qui la constituent sont avec certaines protéines du cytosquelette comme la tubuline, les plus conservées du monde eucaryotes. Les histones de levures sont pratiquement identiques à ceux des eucaryotes complexes. La première raison venant à l'esprit pour expliquer la présence de chromatine est la taille des génomes de cellules complexes. Avec trois milliards de paires de bases, on évoque souvent que le génome humain complètement déroulé atteindrait une taille d'environ un mètre. Cependant, les génomes de microbes eucaryotes, typiquement les levures, ont un génome beaucoup plus modeste, de l'ordre de 15 millions de paires de bases, ce qui équivaut à la taille des plus gros génomes bactériens qui se propagent et se maintiennent en l'absence de chromatine. Il est donc moins évident d'expliquer par le seul fait de l'augmentation de taille pourquoi une structure aussi complexe a été sélectionnée et développée.

Depuis une dizaine d'années, l'étude de la biologie de la chromatine et de ces modifications s'est fortement développée et constitue aujourd'hui un des thèmes principaux de la biologie moléculaire actuelle. La raison principale de cette expansion est sans aucun doute la prise de conscience que l'apparition de la chromatine constitue le pallier décisif requis pour l'apparition d'organismes multi-cellulaires avec des types cellulaires hautement différenciés. Cette caractéristique se retrouve déjà chez les champignons et les levures. En 1999, Kevin Struhl proposait que la logique fondamentalement différente de la régulation de l'expression chez les procaryotes et les eucaryotes est une des clés pour expliquer la complexification de ces derniers (Struhl, 1999). En effet, l'apparition de la chromatine a généré des génomes « fermés » nécessitant principalement des programmes d'activation alors que le génome « ouvert » procaryote requiert plutôt des programmes de répression, l'ADN étant naturellement accessible à la machinerie d'expression : l'ARN polymérase. La découverte d'« îlots d'hétérochromatine » qui éteignent de façon stricte l'expression des gènes de différenciation de la levure supporte parfaitement ce concept (Zofall et al., 2012).

La compréhension des mécanismes moléculaires de la différenciation cellulaire passera donc en partie par la compréhension de la biologie de la chromatine, à savoir comment des signaux extracellulaires peuvent conduire une cellule à activer un programme d'expression pour entamer un processus le plus souvent irréversible qui en fera une machine hautement spécialisée. Dans ce contexte, une description précise de la structure chromatidienne, de ses modifications et des régulations globales et locales de celles-ci est indispensable. La levure offre la possibilité d'étudier par analyse génétique, c'est-à-dire par la création de mutants, les éléments qui constituent la chromatine.

Ce travail s'inscrit dans cette perspective et plus précisément dans la création de mutants non acétylables de l'histone H4, un des constituants de l'unité de base de la chromatine : le nucléosome.

A. Le modèle d'étude : la levure de fission

La levure de fission, qui doit son nom à son type de division par fission binaire, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) est un organisme eucaryote unicellulaire très éloigné de sa populaire cousine, la levure de boulangerie, ou levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Il est communément admis que ces organismes ont divergé il y a 500 à 700 millions d'années, ce qui les rend aussi différentes entre elles qu'elles ne le sont des

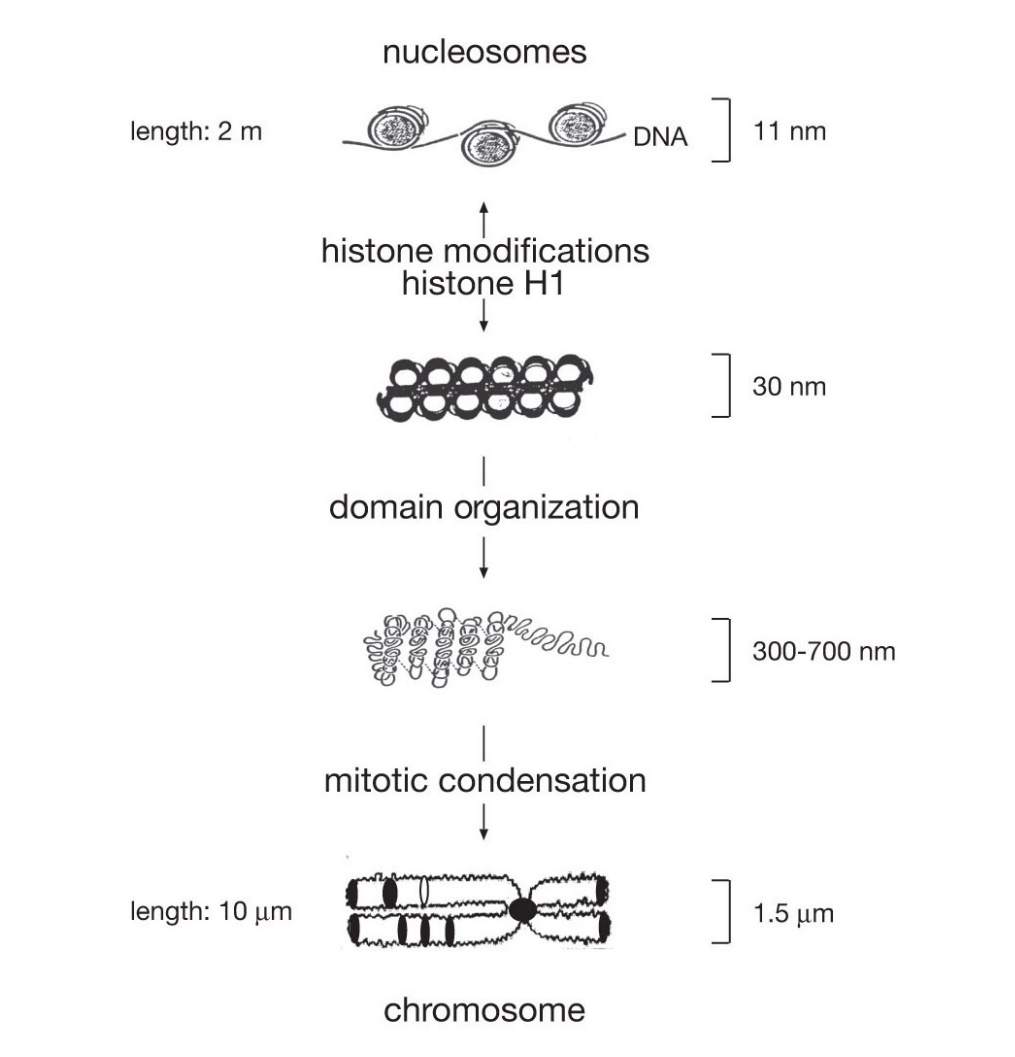


Figure 3 : Structure de la chromatine (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press)

La fibre de 11 nm représente l'ADN enroulé autour des nucléosomes. La fibre de 30 nm est plus compacte mais la structure n'est pas encore confirmée (illustrée comme une conformation solénoïde), impliquant l'histone H1. la fibre 300-700 nm représente une boucle dynamique d'ordre supérieur. Le chromosome condensé fait 1,5 μ m et représente la forme la plus compactée de la chromatine qui apparaît seulement lors de la division nucléaire.

mammifères. Ce champignon possède un génome compact, un des plus petits génomes eucaryotes séquencés, d'environ 13 millions de paires de bases répartis en trois chromosomes dont la séquence a été établie il y a une dizaine d'années (Wood et al., 2002). La levure de fission est un modèle établi de l'étude du cycle cellulaire et de la morphogénèse et a permis une découverte fondamentale dans ce registre : les kinases dépendantes de cyclines (CDK) (Coudreuse and Nurse, 2010; Nurse, 1996, 2012). La levure *S. pombe* a aussi contribué à la compréhension de l'établissement de l'hétérochromatine centromérique (voir ci-dessous) et aux rôles de modifications de la chromatine parfois nommés épigénétiques (Grewal and Jia, 2007). D'un point de vue pratique, c'est un organisme prototrophe dimorphique, ce qui signifie que les levures peuvent adopter un mode de vie unicellulaire, communément utilisé au laboratoire, ou pluricellulaire sous forme de structures nommées pseudohyphes. Son cycle cellulaire est court (2h30 en milieu complet) et permet une utilisation facile en laboratoire. La génétique moléculaire est très bien maîtrisée et permet d'introduire des mutations dans son génome à la résolution d'une paire de bases.

S. pombe est un organisme capable de différenciation sexuelle avec un cycle de vie haplo-diplophasique. En effet, lorsque les conditions deviennent moins favorables (**Figure 1**), typiquement lors d'une carence en azote (Otsubo and Yamamoto, 2012; Yamamoto, 1996), les cellules haploïdes de type sexuel opposé (h^+ et h^-) arrêtent leur cycle cellulaire en G1 et sécrètent un gradient de phéromones sexuelles. Ce dernier permet leur rencontre et fusion cytosolique puis nucléaire pour former un zygote qui va rapidement entrer en méiose pour redonner des produits haploïdes recombinants. Les 4 produits de cette méiose sont appelés spores et sont contenus dans un sac portant le nom d'ascospore. Contrairement à de nombreux microbes, l'état diploïde est transitoire et ne peut être perpétué à l'état végétatif qu'au laboratoire.

Le fait que les spores soient maintenues ensemble dans une ascospore est un avantage considérable pour l'étude de la génétique puisque les produits recombinants d'une seule méiose et la ségrégation de marqueurs peuvent être analysés (voir plus loin).

B. La transcription chez les eucaryotes

Le cœur de l'expression génétique est constitué par la transcription de l'ADN en ARN, même si de nombreux contrôles sont également décisifs au niveau traductionnel. Une des découvertes saisissantes permises en levure grâce aux nouvelles méthodes de séquençage est le fait que la presque totalité, sinon la totalité, du génome est transcrite (Wilhelm et al., 2008). En d'autres termes, il existe dans la cellule une molécule d'ARN correspondant à n'importe quelle séquence d'ADN. Ceci ne signifie évidemment pas que tous les transcrits ont la même abondance mais l'idée que les transcriptomes correspondraient principalement aux ARN messagers, ribosomiques ou de transferts est très éloignée de la réalité (Jacquier, 2009; Jensen et al., 2013). Il existe une pléthore d'ARN non codants : *cut*, *xut*, *tiRNA*, *miRNA*, *siRNA*, *lincRNA* ... dont le catalogue et la description sortent largement du cadre de cette introduction. Nous les mentionnons car ces ARN sont de plus en plus considérés comme des composants intégraux de la chromatine (Keller and Buhler, 2013).

Il existe trois types d'ARN Polymérases chez les eucaryotes. Les types I et III sont responsables de la transcription des ARN ribosomiques et de transfert respectivement. La transcription de tous les autres ARN est réalisée par l'ARN Polymérase II (Pol II). Pol II est un complexe macromoléculaire composé de 12 sous-unités dont la plus grosse, Rpb1, possède en son extrémité C-terminale un domaine (CTD) composé des répétitions (29 chez *S. pombe*) de 7 acides aminés (AA) YSPTSPS (Phatnani and Greenleaf, 2006). Pol II transcrit l'ADN en ARNm selon un cycle composé des étapes suivantes : initiation, élongation et terminaison (Svejstrup, 2004). Il est intéressant de noter que le cœur catalytique des polymérases

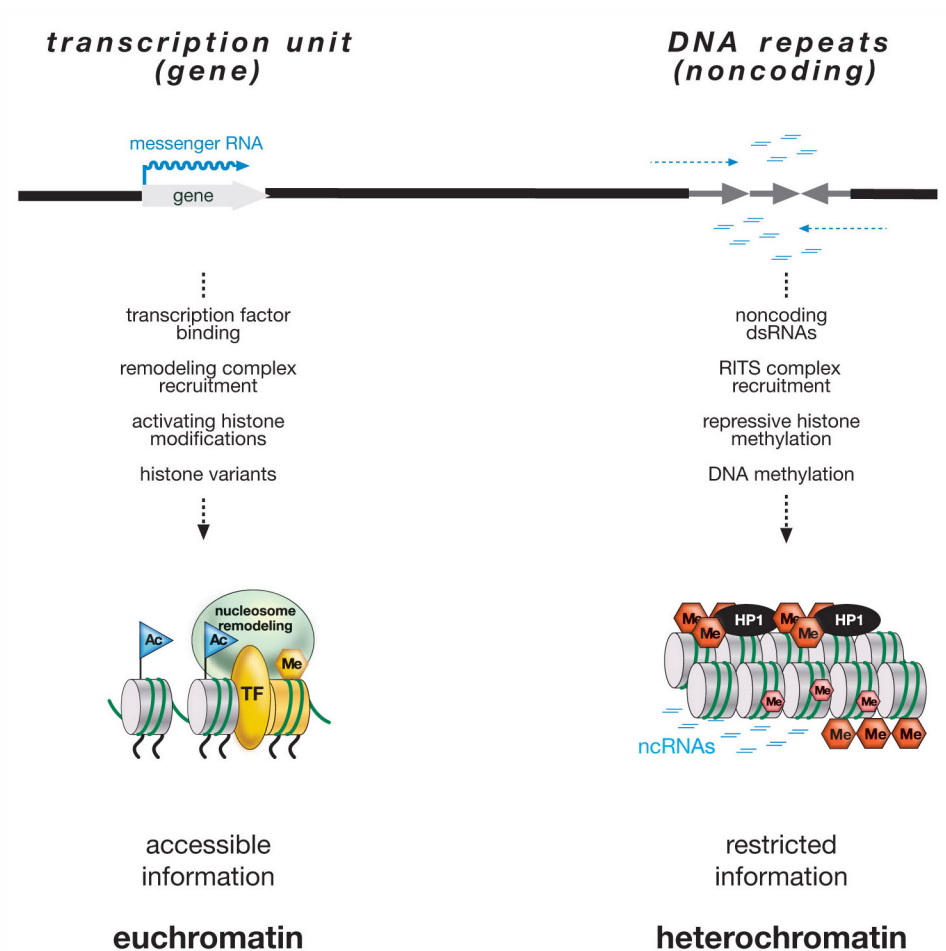


Figure 4 : Différence entre l'euchromatine et l'hétérochromatine (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Résumé des différences entre ces deux états de la chromatine. Les différences incluent le transcrit produit, le recrutement des protéines liant l'ADN (ex: facteur de transcription), les protéines associées à la chromatine, la modification des histones ainsi que la composition des histones.

eucaryotes est proche de celui de la polymérase bactérienne et les deux sous-unités principales, Rpb1 et Rpb2 sont apparentées aux sous-unités bactériennes. Ceci s'explique bien entendu du fait de la conservation des molécules d'ARN et d'ADN. En comparaison, les polymérases eucaryotes ont acquis une dizaine de sous-unités supplémentaires et le CTD. Il est probable que la présence de chromatine qui constitue un obstacle majeur pour les enzymes travaillant sur l'ADN, et l'intégration de signaux plus complexes sont les facteurs qui ont engendré cette complexification. En effet, les nucléosomes doivent être rapidement mobilisés pour permettre le passage de la polymérase et immédiatement repositionnés pour éviter que de la transcription dite « cryptique » apparaisse. Il a été montré que des défauts de « refermeture » de la chromatine entraînent l'apparition de ces transcrits aberrants suite à des initiations opportunistes de la polymérase (Hennig and Fischer, 2013). Des régions spécifiques, souvent localisées au niveau de promoteurs sont dépourvues de nucléosomes et nommées NDR (nucleosome depleted region) (**Figure 2**). Les mécanismes de leur positionnement précis font l'objet de vifs débats dans la communauté scientifique (Korber, 2012).

C. Structure « des » chromatines

La chromatine, et avant elle les chromosomes doivent leur nom au fait que ces structures ont une forte affinité pour de nombreux colorants (du grec *χρώμα*, *chroma* : couleur). Cette affinité varie en fonction du degré de condensation (**Figure 3**), ce qui a permis très tôt de définir deux grands types de chromatine : l'euchromatine qui correspond à une structure relâchée et l'hétérochromatine qui est une forme condensée. Il existe des intermédiaires et contrairement à ce que l'on a longtemps pensé, ces deux formes sont interchangeables. L'euchromatine permet l'expression génétique alors que l'hétérochromatine est dite « silencieuse » ou restrictive (**Figure 4**). Comme nous le verrons plus loin, les deux types de chromatine se distinguent par des marques qui permettent aujourd'hui une identification moléculaire beaucoup plus précise que l'identification cytologique.

L'unité de base est le nucléosome. Le nucléosome est constitué de deux hétérodimères des histones H2A et H2B ainsi qu'un tétramère des histones H3 et H4. D'une manière générale, 147 pb d'ADN s'enroulent sur cette structure globalement sphérique. Les extrémités N-terminales (N-ter) de chaque histone pointent vers l'extérieur de la structure (**Figure 5**) et il a été montré très tôt qu'elles étaient le siège d'un large panel de modifications incluant phosphorylation, ubiquitylation, acétylation et méthylation. A l'inverse, le cœur du nucléosome, est peu sujet à ces modifications et ce probablement pour des raisons d'accès restreint (**Figure 6**).

Il faut aussi noter qu'à côté des histones dits canoniques, il existe une large gamme de variants, c'est-à-dire des protéines apparentées qui ont des fonctions spécifiques. Leur description sort du cadre de cette introduction mais à titre d'exemple le remplacement de l'histone H2A par le variant H2A.Z est corrélé avec l'activité transcriptionnelle et marque l'extrémité 5' des NDR présents aux promoteurs. Le variant H2A.Z est intégré aux lésions qui touchent l'ADN (DNA damage) et est requis pour le recrutement des complexes de réparation (DNA repair) (Jin et al., 2005). La synthèse et la substitution de nombreuses histones ont lieu indépendamment de la phase de réplication de l'ADN. La forme la plus spectaculaire d'échange d'histones a lieu lors de la spermatogenèse où le génome paternel est empaqueté dans des nucléosomes formés de protamines (Balhorn, 2007).

Depuis une dizaine d'années, les modifications de la chromatine sont parfois considérées comme un code. On entend par là qu'une combinaison particulière de modifications serait « lue » par la cellule pour définir un état particulier. Typiquement, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4-me) est associée à une transcription

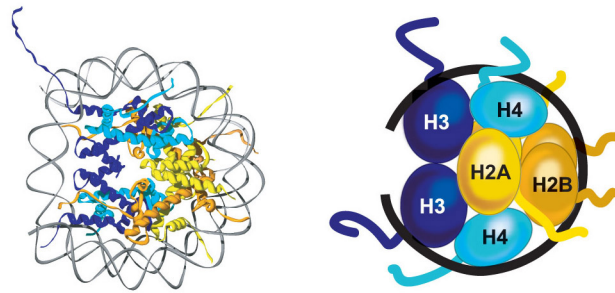


Figure 5 : Structure du nucléosome (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

(Image de gauche) Modèle d'un nucléosome (2,8 Å). (Image de droite) Représentation schématique d'un nucléosome où 147 pb d'ADN (ligne noire) est enroulée autour d'un octamère d'histones. L'octamère est constitué d'un tétramère des histones H3/H4 et de deux dimères H2A et H2B. Les queues N-terminales des histones est en dehors du centre du nucléosome.



Figure 6 : Les différents sites des modifications post-traductionnelles sur les queues des histones (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La queue N-terminale des histones a de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, ubiquitinylation). Le domaine globulaire des histones peuvent également avoir des modifications mais elles se font plus rare. Les lysines acétylables de l'histone H4 sont celles en position 5, 8, 12 et 16.

active et déposée par la méthylase Set1 dont le recrutement dépend du CTD de l'ARN polymérase II (Buratowski and Kim, 2010). A l'inverse, la méthylation de la lysine 9 du même histone (H3K9-me) est typique des régions hétérochromatidiennes et permet la liaison de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1, Swi6 chez *S. pombe*) jouant un rôle décisif dans la formation de l'état condensé (Aygun and Grewal, 2010).

Comme on l'imagine, la combinaison de toutes les modifications rend le code extrêmement complexe et pour en rendre une définition opérationnelle, trois grands types d'effets ont été proposés (**Figure 7**) :

1. Les effets « *cis* » :

La liaison covalente d'un groupe chimique résulte en une altération de la structure ou de la charge et un changement d'organisation locale. Par exemple, le groupement acétyle va neutraliser la charge positive de la lysine modifiée. Ceci aura pour effet de réduire l'attraction électrostatique nucléosome/ADN (Shahbazian and Grunstein, 2007). La chromatine prendra alors une conformation plus lâche permettant un accès plus facile à la machinerie de transcription.

2. Les effets « *trans* » :

La modification de la queue d'histone résulte en une affinité augmentée pour une protéine particulière. C'est le cas de la protéine HP1 mentionnée ci-dessus qui reconnaît et lie fermement les nucléosomes méthylés sur la lysine 9 de l'histone H3.

3. Les effets de remplacements :

Une modification d'histone ou un autre stimulus peut engendrer le remplacement d'un histone canonique par un variant. Par exemple, la région centrale des centromères de *S. pombe* possède le variant CENP-A au lieu de l'histone H3 (**Figure 8**).

Ces trois types d'effets sont souvent concomitants (**Figure 8**).

D. « *Writers* » and « *Readers* ».

On l'a vu, les différentes modifications doivent être « écrites » par des enzymes puis ensuite « lues » d'une manière ou d'une autre par la cellule. Il existe donc une série d'histones acétyl transférase (HAT), d'histones kinases, d'arginine (PRMT) et lysine (HKMT) méthyltransférases qui assurent la synthèse des modifications. De manière remarquable, pour chaque réaction, il existe une enzyme capable de catalyser la réaction inverse, déacétylases (HDAC), phosphatases, déméthylases, ce qui suggère une régulation très dynamique.

De la même manière, les « lecteurs » des modifications appartiennent à différentes familles dont les plus célèbres sont les protéines à bromodomaines qui lient les histones acétylés et les protéines à chromodomaines qui lient les histones méthylés.

Deux grandes difficultés rencontrées dans l'étude des enzymes de modification de la chromatine sont la redondance et la diversité de substrats. Il n'est pas rare en effet que plusieurs HAT ciblent de manière totalement ou partiellement redondante une lysine particulière. De plus, la dénomination HAT est trompeuse puisque ces enzymes possèdent en générale une large gamme de substrats non histone. Certaines sont d'ailleurs conservées chez les bactéries qui ne possèdent pas d'histone. Les expériences classiques d'inhibition par une molécule spécifique posent donc des problèmes d'interprétation. La levure offre une

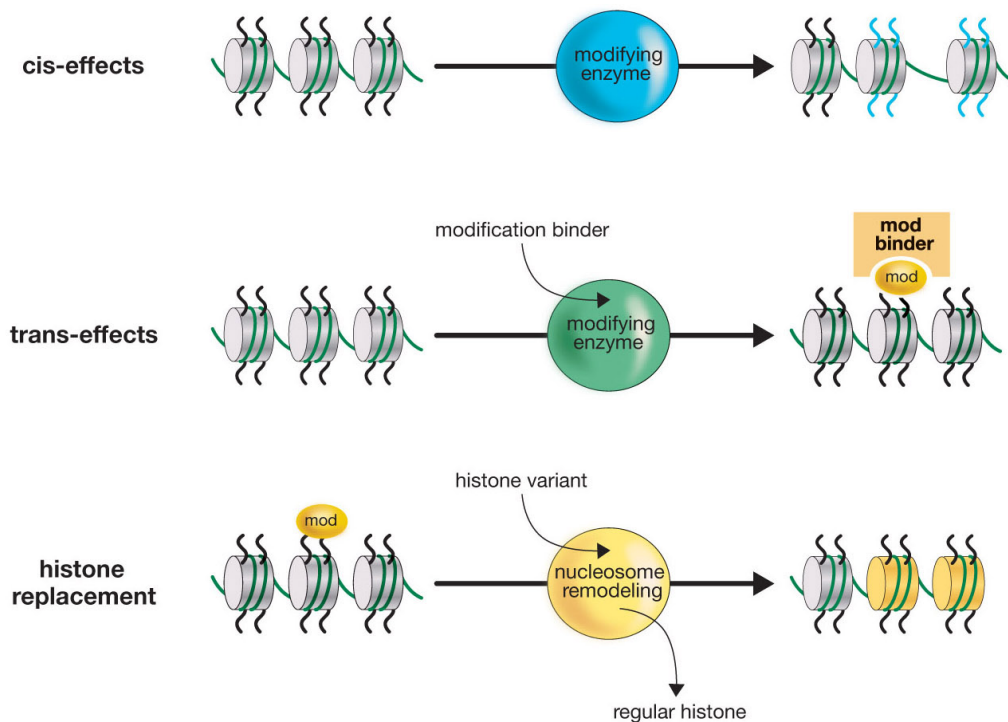


Figure 7 : Effets de la transition de la chromatine (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Les effets en *cis* : une modification covalente au niveau de la queue N-terminale des histones peut altérer la structure ou la charge du nucléosome ce qui va désorganiser la chromatine. Les effets en *trans* : la modification enzymatique de la queue d'histone résulte en une affinité augmentée pour une protéine particulière. Les effet de remplacements : une modification d'histone ou un autre stimulus peut engendrer le remplacement d'un histone canonique par un variant.

alternative unique en permettant la mutation au locus des gènes d'histone et le remplacement d'un résidu spécifique même si, comme nous le verrons dans le chapitre consacré aux résultats, plusieurs contraintes sont d'application dans ce type d'expériences.

Dans le cadre de l'étude de la différenciation sexuelle en cours au laboratoire (Coudreuse et al., 2010), nous nous intéressons au rôle des modifications d'histones et particulièrement de l'acétylation dans l'activation transcriptionnelle du régulateur clé de la gamétogenèse encodé par le gène *ste11*. Le travail de thèse de Philippe Materne au laboratoire a montré en utilisant des mutants *cis* (où la lysine cible de l'acétylation dans la queue d'histone est mutée) que les acétylations des résidus 14 et 36 de l'histone H3 (H3K14-ac et H3K36-ac) ne sont pas essentielles à la croissance végétative de la levure mais sont indispensables à la différenciation sexuelle (P. Materne, travail en cours). Les mutants correspondants sont donc stériles. Notre travail se place dans cette perspective en visant l'analyse de l'acétylation de 4 acides aminés de l'histone H4. Nous allons donc dans les paragraphes qui suivent évoquer les rôles connus ou présumés de ces acétylations et présenter les différentes HAT identifiées à ce jour qui feront l'objet de notre étude.

E. Rôles de l'acétylation de la chromatine.

Les histones sont largement acétylés *in vivo*. On compte au moins 7 sites d'acétylation sur l'histone H3 et au moins 4 sur l'histone H4. Tous les types d'histones peuvent être acétylés.

1. Assemblage du nucléosome.

Une grande partie des histones sont assemblés en nucléosomes pendant la phase de synthèse de l'ADN de manière coordonnée avec le passage de la fourche de réplication (Lucchini and Sogo, 1995). L'acétylation des histones a lieu avant leur intégration au nucléosome et requiert des chaperonnes dont la nature acide peut neutraliser la charge positive des histones et empêcher de ce fait une agrégation ADN-histone plutôt qu'un assemblage en nucléosome (Verreault, 2000). L'acétylation préliminaire participerait au même processus. L'assemblage est suivi par une déacétylation massive considérée comme un « reset » du code (Ruiz-Carrillo et al., 1975). Il est établi que H4K5-ac et H4K8-ac sont acétylés rapidement après la synthèse de la protéine H4 (Sobel et al., 1995). Il existe une grande redondance puisque des mutants H4K5R-K8R (où la lysine est substituée par une arginine non acétylable) combinés à des mutants H3 sans queue N-terminale sont assemblés en nucléosomes *in vitro* (Ma et al., 1998) mais l'addition d'une mutation supplémentaire H4K8R donne lieu à un défaut d'assemblage. Une remarque générale dans notre travail est que la mutation de lysine en arginine empêche l'acétylation mais maintient une charge positive. Il est donc difficile de savoir précisément si on observe un défaut dû à l'absence de groupe acétyle ou au maintien d'une charge positive. Certains auteurs utilisent une alanine comme substitut mais la taille réduite de la chaîne latérale semble alors introduire d'autres effets de structure.

2. Assemblage de la chromatine

L'acétylation constitue un facteur essentiel du degré d'assemblage de la chromatine. C'est également ici que la neutralisation de la charge positive des lysines des extrémités N-terminales semble importante. L'histone H4 joue un rôle primordial dans ce processus *in vitro*

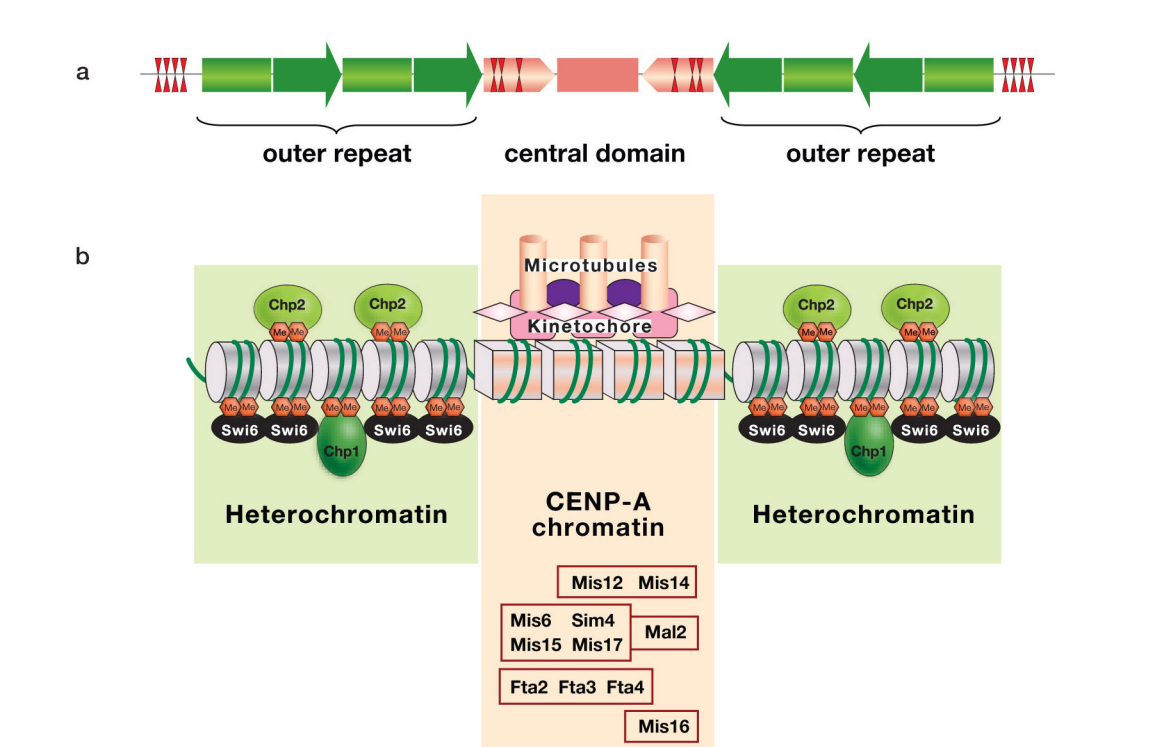


Figure 8 : Distinction de l'hétérochromatine et de la région centrale des centromères de *S. pombe* (Epigenetics © 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

(a) Représentation du centromère chez *S. pombe*.

(b) Les répétitions extérieures sont empaquetées dans les nucléosomes qui sont méthylés. CENP-A est un variant de l'histone H3 se trouvant dans le domaine central du centromère.

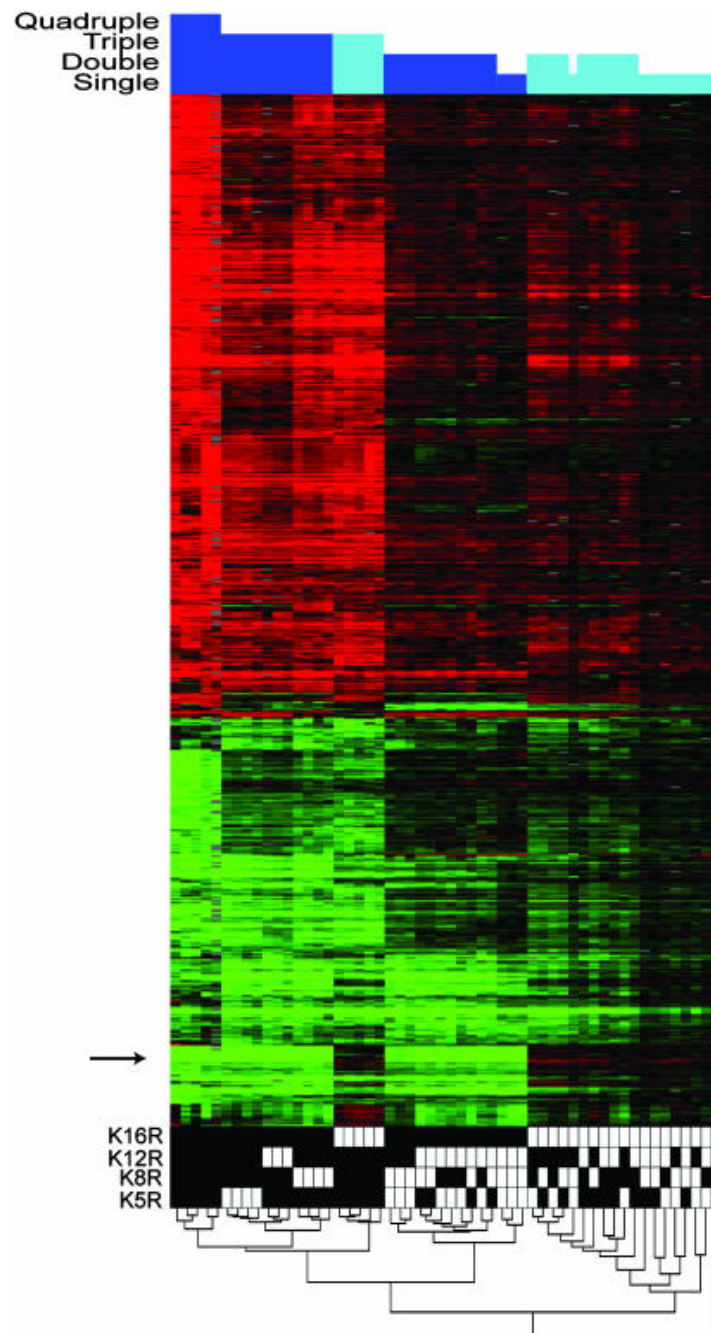


Figure 9 : Vue globale de l'expression génique dans les mutants H4 chez *S. cerevisiae* (Dion *et al.*, 2005).

Les colonnes en bleu représente le nombre de mutation de K \rightarrow R ; bleu foncé = mutant K16R et bleu ciel = K16 WT.

Un dendrogramme est représenté avec les boites blanches correspondant à une lysine WT pour le résidu et les boites noires correspondent à la mutation K \rightarrow R.

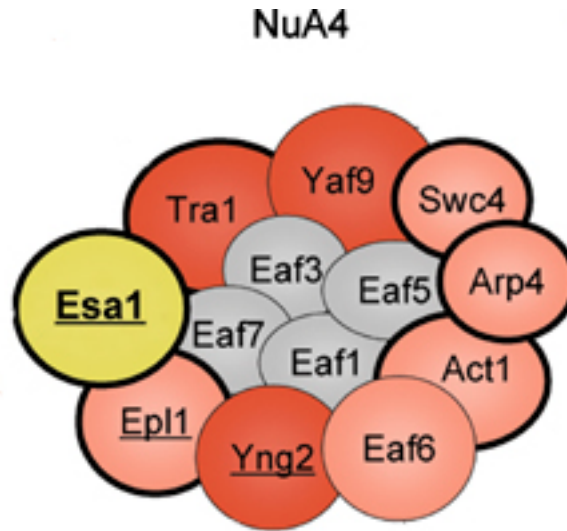


Figure 10 : Sous-unités du complexe NuA4 chez *S. cerevisiae* (Lafon *et al.*, 2007).

Le complexe NuA4 est constitué de treize sous-unités différentes (Tra1, Yaf9, Swc4, Arp4, Act1, Eaf6, Yng2, Epl1, Eaf7, Eaf3, Eaf5, Eaf1 et Esa1). Esa1 est la sous-unité catalytique de ce complexe et c'est l'orthologue de Mst1 chez *S. pombe*.



Figure 11 : Sous-unités du complexe NuA3 chez *S. cerevisiae* (Lafon *et al.*, 2007).

Le complexe NuA3 est constitué de cinq sous-unités différentes (Nto1, Taf14, Eaf6, Yng1 et Sas3). Sas3 est la sous-unité catalytique de ce complexe et Mst2 est son orthologue chez *S. pombe*.

(Siino et al., 2003). La lysine 16 apparaît comme le résidu clé puisque sa seule mutation est suffisante pour causer un défaut de folding de la chromatine *in vitro*.

3. Acétylation et transcription

Du fait de la plus grande fluidité apportée par l'acétylation de la chromatine, celle-ci est considérée comme favorable à la transcription et permettrait de recruter des facteurs de remodelage ayant un rôle positif sur le déplacement de la polymérase. A l'échelle du génome, l'acétylation de H3 et H4 est positivement corrélée avec la transcription (Kurdistani et al., 2004) et les HAT fonctionnent comme activateurs transcriptionnels même si la délétion de la plupart d'entre elles a peu d'effet à l'échelle du transcriptome, sans doute à cause de la redondance évoquée plus haut. D'une manière générale, il est admis que les HAT sont recrutées par des activateurs transcriptionnels comme les facteurs de transcription mais la présence de bromodomaines ou de chromodomaines dans certaines sous-unités de la plupart des HAT plaident aussi pour un mécanisme d'amplification ou pour des interconnexions entre HAT ou bien entre HAT et méthyltransférases.

En plus de l'effet de l'acétylation sur la charge, les HAT peuvent aussi promouvoir la transcription par la liaison d'activateurs à bromodomaines comme Bdf1 chez la levure. Dans le même registre, les complexes de remodelage SWI-SNF et RSC qui ont la capacité de mobiliser les nucléosomes possèdent aussi des bromodomaines et participent de façon active à la dynamique nucléosomale pendant la transcription (Hassan et al., 2002).

4. Un code d'acétylation de l'histone H4 ?

Une étude de 2005 a analysé les conséquences de la mutation, unique ou en combinaison, en arginine mimant l'état chargé déacétylé des 4 lysines acétylées (K5, K8, K12, K16) de l'histone H4 de *S. cerevisiae* à l'échelle du génome (Dion et al., 2005). Elle conclut que seule la mutation de la lysine 16 affecte de manière spécifique la transcription indépendamment de l'état d'acétylation des 3 autres lysines qui ont un rôle cumulatif différent de la lysine 16 (**Figure 9**). Cette étude rapporte aussi que le quadruple mutant n'est pas viable contrairement à toutes les autres combinaisons. A ce jour, aucune étude similaire n'est disponible dans un autre organisme.

F. Les différentes familles de HAT

Il existe cinq grandes familles de HAT classées en fonction de la composition des complexes et de leurs substrats. La famille MYST est représentée par deux complexes chez la levure de fission : les complexes NuA4 et NuA3. La famille GNAT inclut Gen5 associée au complexe SAGA bien caractérisé chez la levure (Wu and Winston, 2002). Les trois autres familles sont les HAT reliées aux facteurs de transcription (TFIID), les HAT reliées aux hormones nucléaires (SRC1 et ACTR) et p300/CBP (Carrozza et al., 2003) : celles-ci n'ont pas d'équivalents connus chez la levure.

1. La famille MYST

a. NuA4

Le complexe NuA4 (Nucleosome Acetyltransferase of histone H4) est principalement impliqué dans l'acétylation de l'histone H4 et H2A (Goto and Nakayama, 2012; Nugent et al., 2010). Ce complexe est composé de treize sous-unités différentes chez *S. cerevisiae* (**Figure**

YEAST SAGA COMPLEX

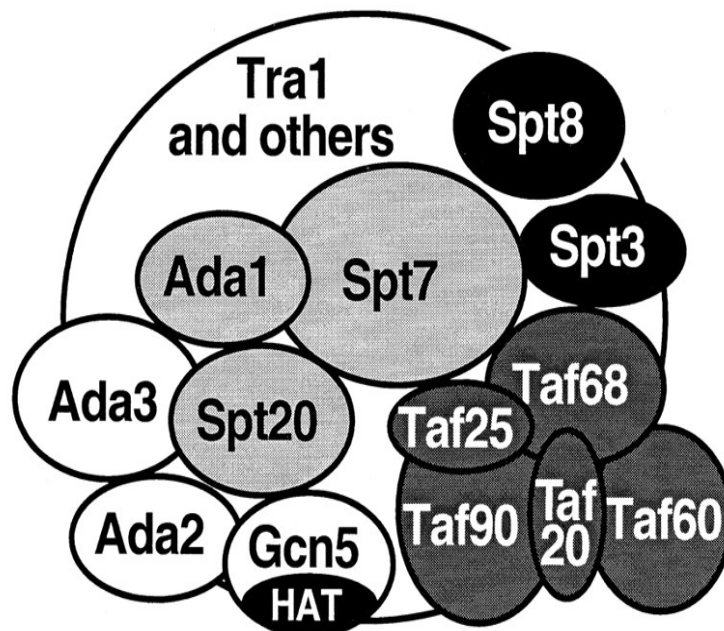


Figure 12 : Sous-unités du complexe SAGA chez *S. cerevisiae* {Sternier, 2000 #48}.

Le complexe SAGA est constitué de quinze sous-unités différentes (Ada1, Ada2, Ada3, Spt20, Spt7, Spt8, Spt3, Taf68, Taf25, Taf90, Taf20, Taf60, Tra1 et Gcn5). Gcn5 est une HAT et c'est la sous-unité catalytique de complexe.

10). Il existe également une forme « piccolo » du complexe qui ne contient que trois protéines : Mst1, Png1 et Epl1 (Shahbazian and Grunstein, 2007). La sous-unité catalytique du complexe NuA4, Mst1, est essentielle chez *S. pombe* (Gomez et al., 2008) et le complexe joue un rôle important dans la maintenance de l'intégrité du génome et la ségrégation chromosomique chez la levure de fission (Kim et al., 2009). Toujours chez *S. pombe*, une autre sous-unité, non essentielle, Png1 a été caractérisée et sa délétion entraîne une diminution de l'acétylation de l'histone H4 sur K5, K8 et K12 (Chen et al., 2010).

b. NuA3

Le complexe NuA3 (Nucleosome Acetyltransferase of histone H3) est composé de cinq sous-unités chez la levure *S. cerevisiae* (**Figure 11**) et joue principalement un rôle dans l'acétylation de l'histone H3 (Chen et al., 2010). La protéine Mst2 est la sous-unité catalytique, et à l'inverse de *mst1*, le gène *mst2* n'est pas essentiel (Gomez et al., 2008). La composition du complexe chez *S. pombe* est un peu différente et compte 7 protéines (Wang et al., 2012).

2. La famille GNAT

La super-famille de GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) contient deux complexes connus et apparentés chez les levures : les complexes SAGA et SALSA / SLIK (Wu and Winston, 2002). Leur composition diffère mais ils contiennent tous deux Gcn5 comme HAT. Peu de choses sont décrites pour les complexes SALSA / SLIK. Le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) est par contre mieux caractérisé. Il joue un rôle clé dans l'acétylation et, en tant que co-activateur, dans le recrutement de la protéine TATA-Binding (TBP) et de la Pol II (Larschan and Winston, 2005). Le complexe SAGA possède quinze sous-unités et Gcn5 est une des sous-unités catalytiques et constitue l'HAT. Elle joue un rôle dans l'acétylation des histones, principalement H3 et H2B (**Figure 12**). Ce complexe a été découvert chez *S. cerevisiae* (Koutelou et al., 2010) et est très conservé parmi les eucaryotes incluant *S. pombe* (Helmlinger et al., 2011).

Comme on peut le constater, les différentes HAT sont peu caractérisées, elles appartiennent à des complexes eux-mêmes partiellement définis. On peut résumer l'état des connaissances en disant que Gcn5 et Mst2 sont impliquées dans l'acétylation de l'histone H3 et que Mst1 est impliquée dans l'acétylation de H4. La seule HAT essentielle est Mst1, sans qu'on sache si le substrat qui doit absolument être acétylé par Mst1 est une histone.

Dans le cadre de ce travail, nous avons entrepris l'analyse de la relevance biologique de l'acétylation de H4 par une approche génétique consistant à muter les résidus acétylés et les HAT présumées.

OBJECTIFS DU MEMOIRE

III. Objectifs du mémoire

A. Identification des HAT de l'histone H4 chez *S. pombe*

Le premier objectif de ce mémoire est de déterminer la contribution des différentes Histone Acétyltransférases (HAT) de *S. pombe* dans l'acétylation de l'histone H4. Pour ce faire, des mutants, individuels ou combinés, dans les gènes encodant les sous-unités catalytiques de ces HAT, seront construits.

La disponibilité sur le marché d'anticorps spécifiques ciblant tour à tour une des 4 lysines acétylées sur H4 permettra de tester l'absence des différentes HAT sur le niveau d'acétylation de H4.

B. Création de mutants non-acétylables pour l'histone H4 chez *S. pombe*

Le second objectif est l'obtention et la caractérisation de mutants en *cis* non-acétylables pour l'histone H4. La stratégie repose sur le remplacement des lysines aux positions 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 par des arginines fonctionnellement proches des lysines mais non-acétylables. La présence dans le génome de *S. pombe* de trois copies du gène encodant l'histone H4 demandera le développement d'une méthode séquentielle pour déléter deux copies et garantir l'intégration des mutants au locus encodant la troisième.

RESULTATS

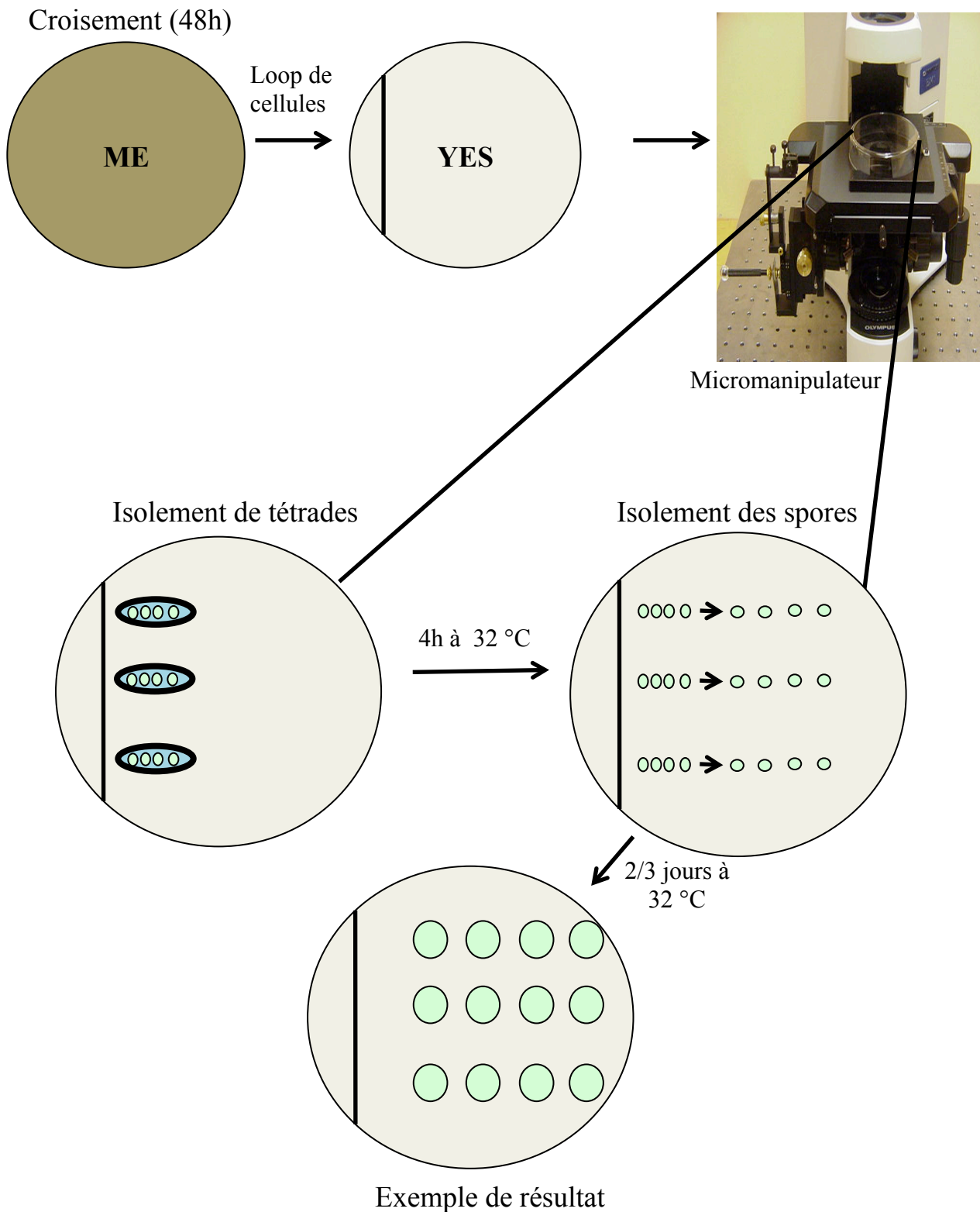


Figure 13: Principe de la dissection de tétrade.

Un croisement entre deux souches est réalisé sur ME. Ensuite, un loop est mis sur un bord défini de la boîte YES. Les tétrades sont isolées au micromanipulateur puis elles sont placées à 32°C pendant 4 heures pour permettre à l'asque d'être digéré. Ensuite, les spores de chaque asque sont séparées et agencées dans une « matrice » sur la boîte. Après 2/3 jours, les colonies sont observables.

IV. Résultats

Ce travail reposant principalement sur une analyse génétique en levure, il nous semble approprié de commencer par une description détaillée de cette méthode. La reproduction sexuée de la levure implique l'entrée en méiose d'une cellule diploïde et les recombinaisons intra- et interchromosomiques qui vont générer des nouvelles combinaisons génétiques (**Figure 1**). A l'inverse des eucaryotes supérieurs, les gamètes peuvent se multiplier de manière végétative à l'état haploïde, ce qui permet d'observer facilement des phénotypes récessifs. L'état diploïde est obtenu par fusion des cytoplasmes et noyaux entre deux cellules de type sexuel opposés. Ce phénomène est appelé « conjugaison ». Les haploïdes de forme ronde sont appelés « spores » et restent groupés dans un sac nommé « asque » qui correspond à la paroi de la cellule mère. Cette caractéristique unique permet d'observer une méiose à la fois et la ségrégation des allèles dans les gamètes, on parle alors de « tétrades ». Pour autant que les phénotypes visuels ou moléculaires soient identifiables, il est donc relativement aisé de combiner des mutants. Les spores recombinantes peuvent être disséquées, c'est-à-dire séparées à l'aide d'un micromanipulateur, ou bien analysées à l'échelle d'une population, on parle alors de « random spore analysis - RSA ». Dans le premier cas, les tétrades sont analysées séparément, dans le second elles le sont de manière globale.

A. Dissection de tétrades (Figure 13)

Tout d'abord, un croisement entre deux souches de mating types opposés (h^+ et h^-) est réalisé sur milieu ME pauvre en azote. Cette carence en azote déclenche la différenciation sexuelle de *S. pombe*. Les haploïdes vont fusionner pour former un diploïde qui va initier la méiose dans la foulée. Après deux jours, de nombreuses tétrades sont normalement visibles au microscope. Le micromanipulateur permet de les isoler et en quelques heures, la sécrétion par les spores d'un cocktail d'enzymes mène à la digestion de la paroi de l'asque et la libération des haploïdes. Le micromanipulateur est de nouveau utilisé pour séparer les spores haploïdes les unes des autres. Dans les heures qui suivent, ces spores germent, c'est-à-dire qu'elles reprennent l'apparence typique de levure de fission. Après deux jours, elles forment des colonies si elles sont viables. Dans le cas contraire, elles meurent à l'état de spores germées, ou de microcolonies, et on peut observer ce qu'on appelle le phénotype terminal.

La ségrégation des allèles d'intérêt peut être vérifiée sur différents milieux sélectifs en fonction de la présence d'un marqueur d'intérêt, typiquement la résistance à un antibiotique. En effet, il est commun d'utiliser une cassette de résistance à l'antibiotique pour déléter un gène mais des marqueurs métaboliques d'auxotrophie (croissance sur un milieu sans uracile suite à une mutation dans le gène *ura4* par exemple) ou des phénotypes visuels (cellules allongées par exemple) sont aussi couramment utilisés. Un phénotype moléculaire peut être testé par PCR directement sur une des colonies.

Une des forces du procédé est la nécessité d'obtenir une ségrégation dite « 2:2 » qui avère que le croisement s'est bien déroulé. Par exemple, si les parents sont respectivement résistants aux antibiotiques X et Y, deux spores devront nécessairement être résistantes à X et deux à Y. Si les combinaisons parentales sont obtenues, on parlera de « ditype parental ». Si au contraire, des combinaisons non parentales sont obtenues, dans notre exemple deux spores sensibles à X et Y, et deux spores résistantes à la fois à X et Y, on parle de « ditype non-parental ». Enfin, le « tétratypage » correspond à toutes les combinaisons possibles : une spore résistante à X, une spore résistante à Y, une spore résistante à X et Y, une spore sensible à X et Y.

Il est bien évident que ces ségrégations obéissent aux lois de la génétique classique qui reposent essentiellement sur la position des marqueurs et leurs distances respectives sur les chromosomes. Comme le génome de *S. pombe* est séquencé, on dispose de la carte physique,

| Δgcn5 x Δpng1 | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----|---|-------|-------|-------|---|-----|-------|-------|---|---|-------|
| A | YES | + | + | - | - | H | YES | + | + | - | - | |
| | YEN | - | + | - | - | | YEN | + | - | - | - | |
| | YEK | + | - | - | - | | YEK | - | - | - | - | |
| | | | | Létal | Létal | | | | | | | |
| B | YES | - | + | - | + | I | YES | + | - | - | + | |
| | YEN | - | + | - | + | | YEN | + | - | - | - | |
| | YEK | - | + | - | - | | YEK | - | - | - | + | |
| | | | | | | | | Létal | Létal | | | |
| C | YES | + | - | - | + | J | YES | + | + | - | + | |
| | YEN | - | - | - | - | | YEN | - | - | - | - | |
| | YEK | - | - | - | - | | YEK | + | - | - | - | |
| | | | | | | | | | | | | |
| D | YES | - | + | + | + | K | YES | + | + | + | + | |
| | YEN | - | + | - | + | | YEN | + | + | - | - | |
| | YEK | - | - | + | - | | YEK | - | - | + | + | |
| | | | | | | | | | | | | |
| E | YES | + | + | + | + | L | YES | + | + | + | + | |
| | YEN | + | + | - | - | | YEN | + | + | - | - | |
| | YEK | - | - | + | + | | YEK | - | - | + | + | |
| | | | | | | | | | | | | |
| F | YES | + | - | + | + | M | YES | + | + | + | - | |
| | YEN | - | - | + | - | | YEN | + | - | - | - | |
| | YEK | + | - | - | - | | YEK | - | + | - | - | |
| | | | Létal | | | | | | | | | Létal |
| G | YES | + | + | - | + | N | YES | + | - | + | + | |
| | YEN | - | - | - | + | | YEN | + | - | - | - | |
| | YEK | + | - | - | - | | YEK | - | - | + | - | |
| | | | | Létal | | | | | Létal | | | |

Tableau 1 : Dissection de tétrades du croisement $\Delta gcn5 \times \Delta png1$.

Chaque lettre (A à N) correspond à une tétrade disséquée. Les tétrades sont étalées sur milieu riche (YES) puis répliquées sur milieu antibiotique : Nourséothricine (YEN) ou Kanamycine (YEK). La souche parentale $\Delta gcn5$ est délétée via une cassette Nat et la souche parentale $\Delta png1$ est délétée via une cassette Kan.
(+ : la colonie pousse ; - : la colonie ne pousse pas)

ce qui permet de prévoir le taux de recombinaison et finalement d'estimer si un grand nombre de tétrades devront être observées (le cas de marqueurs proches où les combinaisons parentales vont primer) ou au contraire si quelques tétrades suffiront à trouver les combinaisons recherchées (le cas de marqueurs non liés qui ségrégent indépendamment).

B. « Randon Spore Analysis – RSA »

Si les premières étapes sont identiques à la dissection de tétrades, la RSA implique de traiter avec un mélange d'enzymes commercial le croisement après deux jours pour libérer les spores. Dans ce cas, un grand nombre de spores sont obtenues mais leur lien de parenté ne peut être établi. Cette méthode a le gros avantage de permettre de cribler un très grand nombre de spores recombinantes. Dans l'exemple pris ci-dessus, si deux gènes très proches sont délétés par les marqueurs de résistance aux antibiotiques X et Y respectivement, la probabilité que ces marqueurs se séparent lors de la méiose est très faible, les combinaisons parentales seront invariablement retrouvées lors d'une dissection de tétrades. L'analyse de millions de spores permet d'isoler les individus rarissimes qui proviennent d'une méiose recombinante pour ces marqueurs (un individu résistant à X mais sensible à Y).

Le revers de cet avantage est précisément le fait que seules les combinaisons viables peuvent être analysées et qu'elles sont sélectionnées avec le plus souvent une pression forte, ce qui peut mener à l'identification d'un suppresseur : une mutation par définition rarissime qui va interférer avec un phénotype. Par ailleurs, la RSA ne permet pas de cartographie génétique puisque le taux de recombinaison est inconnu, ou en tous cas imprécis.

Comme nous l'avons dit, la plus grande partie de ce travail repose sur l'analyse génétique de mutants pour les différentes HAT d'une part, et pour des mutations précises de résidus acétylés sur l'histone H4 d'autre part.

C. Identification des HAT de l'histone H4 chez *S. pombe*.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la levure *S. pombe* possède trois complexes connus pour posséder une activité HAT chez *S. pombe*, NuA3, NuA4 et Gcn5-SAGA. Afin d'étudier l'implication possible de ces HAT dans l'acétylation de l'histone H4, des mutants de chaque sous-unités catalytiques ont été utilisés. Pour NuA3, c'est le gène codant pour la sous-unité catalytique Mst2 qui est délété, pour SAGA, c'est le gène codant pour la sous-unité catalytique Gcn5 qui est délété. Cependant, pour NuA4, la sous-unité catalytique Mst1 est essentielle, et nous avons eu recours à un mutant thermosensible précédemment rapporté, mais peu décrit (Gomez et al., 2008). Dans le complexe NuA4, la délétion d'une sous-unité non-essentielle, Png1, a été décrite pour entraîner une diminution de l'acétylation de l'histone H4 (Chen et al., 2010), et sera également utilisée.

Notre premier objectif a été de croiser différents mutants afin de tester s'il existe une redondance dans l'activité de ces différentes HAT au niveau de l'acétylation de l'histone H4. Les combinaisons suivantes de mutants ont d'abord été créées : *png1/mst2*, *gcn5/mst2* et *gcn5/png1*.

Les deux premiers doubles mutants *png1/mst2* et *gcn5/mst2* ont été obtenus sans difficulté par RSA à l'inverse du dernier, *gcn5/png1*, pour lequel aucun candidat n'est obtenu, suggérant la possibilité que la combinaison des délétions de *gcn5* et *png1* soit létale. Cette hypothèse a été testée par une dissection de tétrades qui permet de suivre la ségrégation des allèles et donc de mettre en évidence une combinaison non-viable éventuelle. Le **tableau 1** présentent les résultats de l'analyse des tétrades obtenues à partir d'un croisement des souches *gcn5::natR* et *png1::kanR*. Dans ces souches, les gènes *gcn5* et *png1* ont été remplacés par les

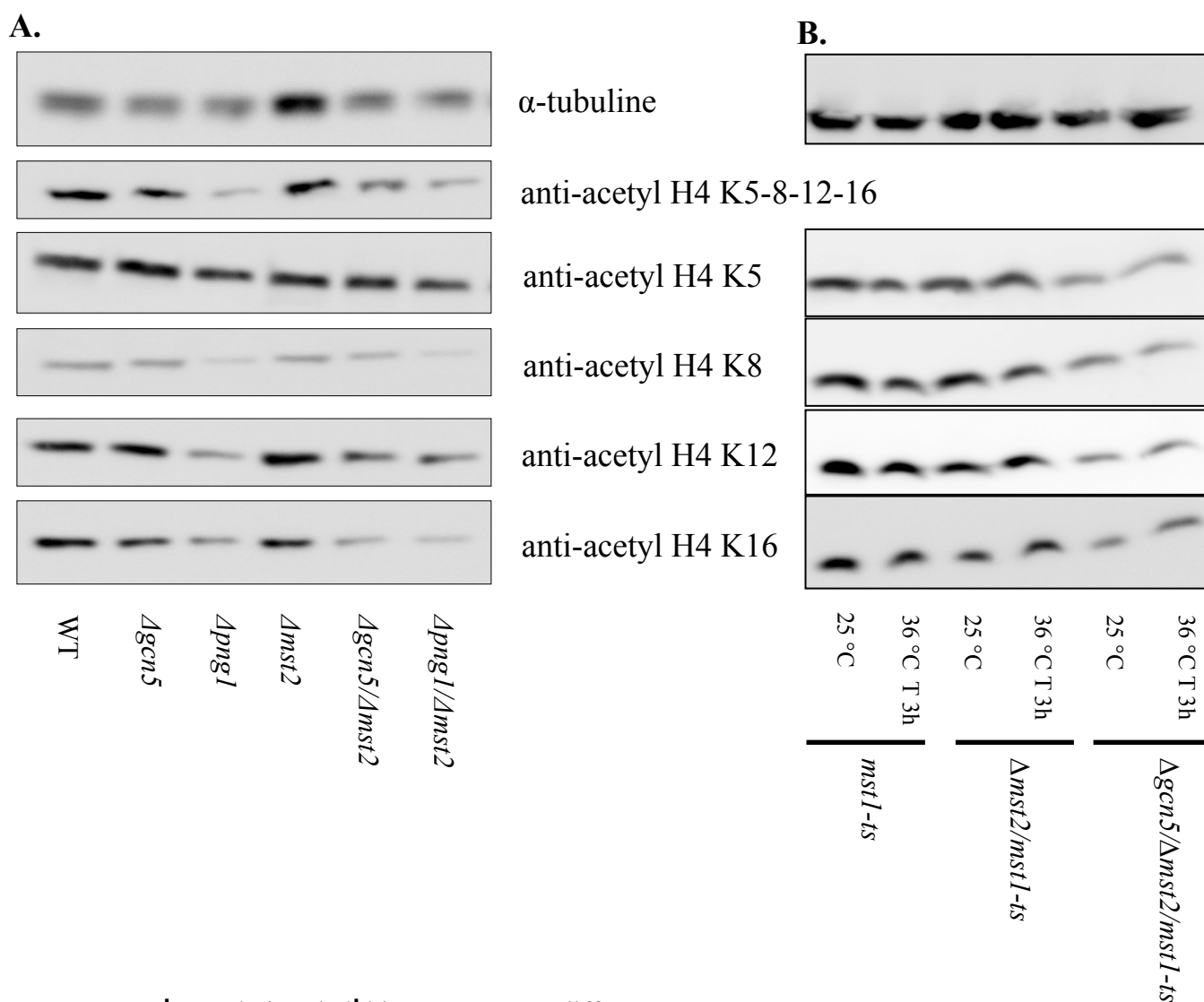


Figure 14 : L'acétylation de l'histone H4 pour différentes HATs

A : Plusieurs anticorps anti-acétyles, ciblant les quatre lysines acétylables ou une lysine à la fois de l'histone H4, sont utilisés pour évaluer l'acétylation. Les souches WT, $\Delta gcn5$, $\Delta png1$, $\Delta mst2$, $\Delta gcn5/\Delta mst2$ et $\Delta png1/\Delta mst2$ sont analysées sur un gel pré-coulé de 8-16%.

B : Les souches *mst1-ts*, $\Delta mst2/mst1-ts$ et $\Delta gcn5/\Delta mst2/mst1-ts$ sont également analysées sur un gel pré-coulé de 8-16%. Les souches TS subissent un choc thermique à 36 °C pendant 3 heures et de la thiamine est également ajoutée.

Un anticorps anti- α -tubuline est utilisé comme contrôle de chargement. (H4 ~ 11,42 kDa et α -tubuline ~ 50 kDa).

marqueurs de résistance à la nourséothricine (*natR*) et la généticine (*kanR*) respectivement. Après dissections, la croissance de colonies obtenues est observées sur milieu YES (milieu riche), milieu YEN (milieu riche supplémenté de nourséothricine) et milieu YEK (milieu riche supplémenté de généticine). Les tétrades E, K et L sont des ditypes parentaux. Les tétrades A et I correspondent à des ditypes non parentaux. Les tétrades B, C, D, H, I sont suspectes car la ségrégation ne correspond pas à la règle 2 :2. Par exemple, pour la tétrade B, on observe qu'une des spores a le génotype recherché (croissance sur *natR* et *kanR*), mais on ne retrouve pas la seconde spore poussant sur YEN. Ces problèmes trouvent au moins deux origines. D'abord des erreurs de dissection qui viennent du fait qu'il est possible de saisir avec le micromanipulateur une tétrade sur laquelle une spore non apparentée est attachée par simple adhésion, sans qu'elle soit très visible. Ensuite, il ne faut pas oublier que nous travaillons avec des mutants qui, s'ils sont viables, présentent une série de phénotypes (retard de croissance, sensibilité accrue). Dans ce contexte il arrive que des spores ne survivent pas à la dissection, ce qui peut troubler l'interprétation des résultats. En considérant les tétrades où les spores ont correctement germé, on peut conclure que la combinaison de la délétion de *gcn5* et *png1* est systématiquement létale. La conclusion la plus simple étant que ces gènes partagent une fonction essentielle.

En parallèle, le mutant *mst1-ts* a été croisé avec des souches délétées respectivement pour *mst2* et *gcn5*. Le mutant conditionnel a permis d'obtenir les combinaisons attendues *mst1-ts/gcn5::natR* et *mst1-ts/mst2::ura4*.

D. Etude de l'acétylation de l'histone H4 dans les mutants simples ou combinés de HAT.

Les souches générées nous ont permis d'étudier par western-blot les effets de l'absence des différentes HAT sur le niveau d'acétylation de H4. Il existe 4 résidus décrits comme acétylés sur H4 : les lysines K5, K8, K12 et K16 et des anticorps commerciaux sont disponibles pour sonder indépendamment ou de manière commune leur état d'acétylation.

Des extraits protéiques totaux ont été préparés et séparés par PAGE puis transférés sur membrane. Il est à noter qu'au vue des difficultés à détecter l'histone H4 (le poids moléculaire est de 11 kDa), nous avons préféré aliquoter l'extrait et utiliser plusieurs gels plutôt que de « stripper » la membrane et procéder à des hybridations successives. Certains mutants montraient des retards de croissance importants et il a de ce fait été difficile de normaliser les extraits sur la croissance. Le dosage d'extraits totaux bruts de levure (requis pour obtenir les histones) est très imprécis à cause de la présence de morceaux de parois qui tendent à précipiter et à interférer avec les méthodes classiques de dosage. Après plusieurs essais non fructueux de normalisation avec un anticorps anti-H4 total, celui-ci a été remplacé par un anticorps anti-tubuline. Le batch de l'anticorps anti-H4 est ici remis en question car le même anticorps a déjà été utilisé chez *S. pombe* par le passé (Chen et al., 2010). Pour l'analyse de la **Figure 14**, Nous gardons à l'esprit que la quantité d'extrait est à l'évidence plus importante pour le mutant *mst2* alors qu'elle semble équivalente dans les autres cas.

Comme le montre la **Figure 14**, parmi les simples mutants testés, seul le mutant $\Delta png1$ montre une diminution significative de l'acétylation de l'histone H4. Celle-ci se remarque au niveau de tous les résidus acétylables à l'exception de K5 où elle est peu évidente. A cette différence près, les résultats sont donc en accord avec ceux de l'équipe de Hong Lu (Chen et al., 2010). Les simples mutants $\Delta gcn5$ et $\Delta mst2$ ne montrent quant à eux pas de diminution d'acétylation évidente bien qu'il faille être prudent pour *mst2* puisque le chargement est plus important. Dans le double mutant *png1/mst2*, la diminution d'acétylation est toujours visible mais ne semble pas fortement aggravée par rapport au simple mutant *png1*. Le double mutant *gcn5/mst2* est clairement affecté par rapport aux simples mutants correspondant, suggérant

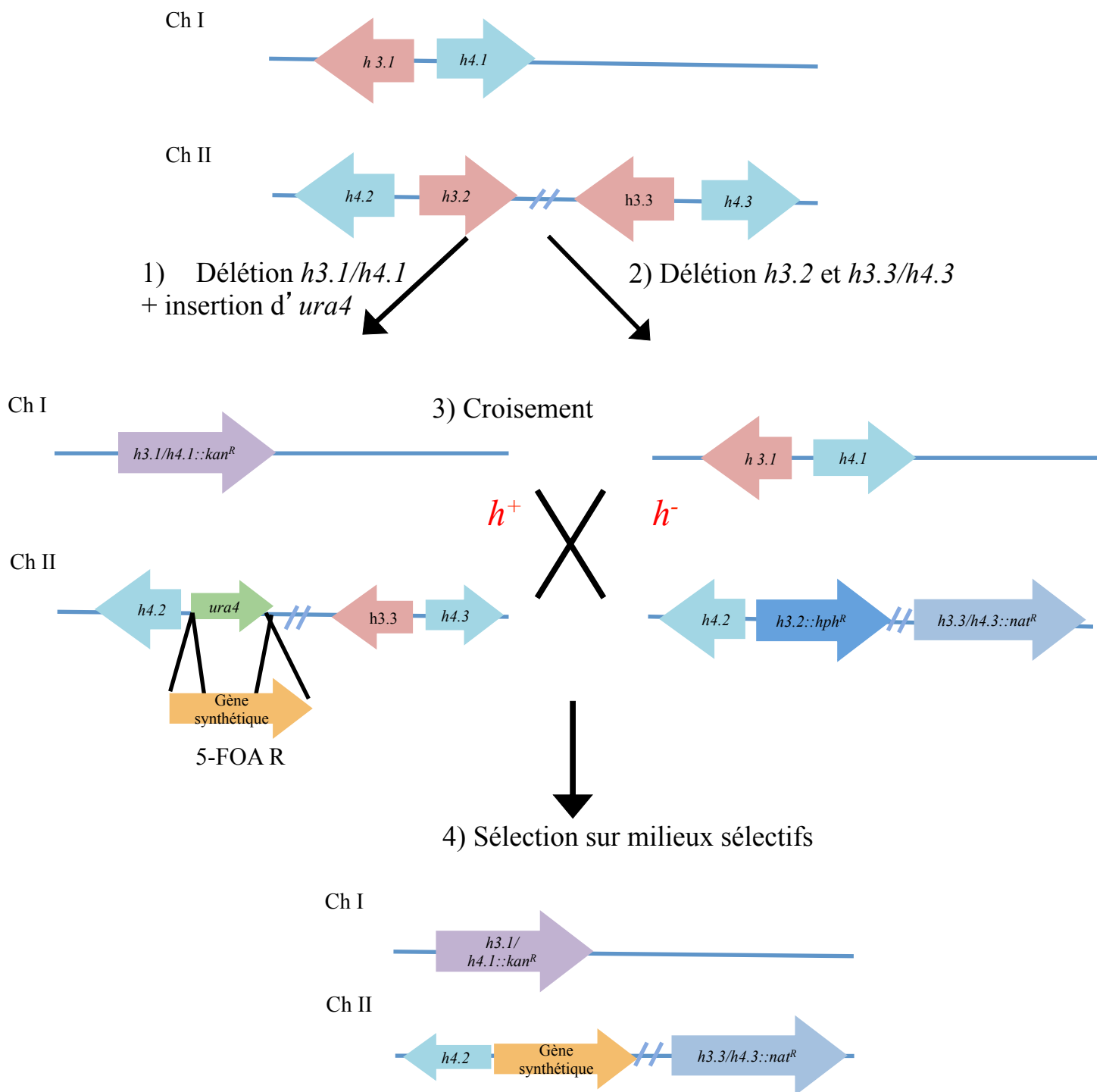


Figure 15 : Stratégie pour obtenir un mutant non-acétylable de l'histone H3

À partir d'une souche WT, une délétion de la copie 1 est réalisée ainsi que l'insertion d'un gène *ura4* au locus *h3.2*. Ensuite, le gène *ura4* de la souche obtenue est remplacé par un gène synthétique qui est sélectionné sur 5-FOA R. Ensuite, cette souche est croisée avec une autre souche délétée pour la copie *h3.2* et la copie 3. Le but est d'obtenir une souche délétée pour la copie 1 et 3 et ayant l'insertion du gène synthétique au locus *h3.2*.

une redondance possible de ces deux HAT dans l'acétylation de H4. Il est toutefois difficile de comparer avec le simple mutant *mst2* pour la raison évoquée ci-dessus.

De façon générale, aucun des mutants testés ne semble affecter de manière marquée le niveau d'acétylation de H4 K5, et aucune combinaison ne résulte en une perte de détection totale de l'acétylation d'un des résidus.

Une expérience similaire a été réalisée avec le mutant *mst1-ts*, seul ou combiné avec la délétion de *mst2*, ainsi qu'avec un triple mutant *mst1-ts /mst2/gcn5* pour lequel toutes les sous-unités catalytiques des HAT sont touchées. La croissance à 36 °C du mutant *mst1-ts* pendant 3 heures semble affecter très légèrement le niveau d'acétylation de H4. Il faut préciser que ce mutant a été généré de façon inhabituelle. Le gène *mst1* est délété au locus et un allèle muté, supposé thermosensible est intégré au locus *leu1* sous le contrôle d'un promoteur réprimé par la thiamine (Gomez et al., 2008). Ni le choc thermique, ni la présence de thiamine n'arrête la croissance et il faut combiner les deux traitements pour obtenir un défaut de croissance net. Il est donc probable que ce mutant n'est pas thermolétal au sens strict et qu'un résidu d'activité de la protéine persiste, compliquant les analyses. Comme nous l'avons dit, il n'a pas été caractérisé en détail dans la littérature.

La souche triple mutante *gcn5/mst2/mst1-ts* montre une diminution évidente d'acétylation pour les quatre anticorps indépendamment du choc thermique, y compris pour la lysine 5 (**Figure 14b**). Ceci semble confirmer la conclusion précédente que le double mutant *gcn5/mst2* présente un déficit d'acétylation de H4.

Nous concluons que

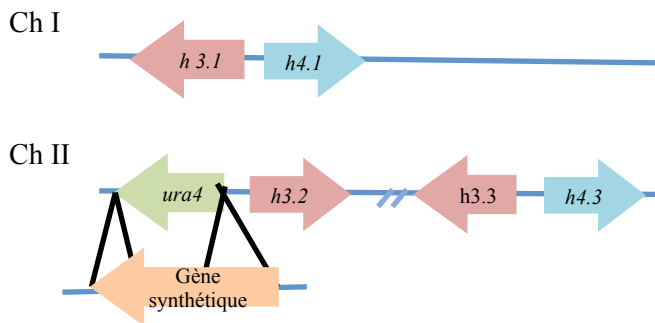
- le mutant *mst1-ts* ne reproduit pas le défaut d'acétylation observé en absence de *png1* qui encode une sous-unité non essentielle du même complexe.
- Les HAT Gcn5 et Mst2 pourraient intervenir dans l'acétylation de H4 de manière redondante puisqu'un effet n'est observé que quand les deux gènes sont délétés.
- Le fait que le double mutant *png1/gcn5* soit non viable pourrait traduire le fait que la perte totale de l'acétylation de H4 est létale. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes attelés à créer des mutants de H4 non acétylables.

E. Génération de mutants non acétylables de l'histone H4

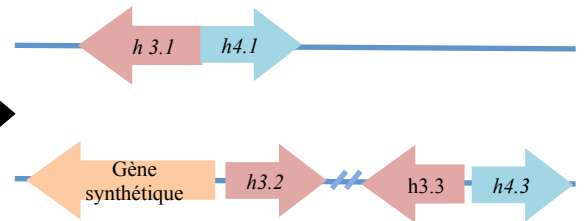
Nous l'avons vu, aucun des mutants de HAT testés ne perd totalement l'acétylation de l'histone H4, en tous cas d'après la détection par les anticorps commerciaux utilisés. La création de mutants « *cis* » où le site acétylé est muté se présente donc comme une évidence alternative. Elle présente deux difficultés importantes. D'abord les gènes d'histones sont présents en trois copies dans le génome de *S. pombe*, probablement pour répondre à la demande massive en cours de réplication. Les gènes encodant l'histone H4 sont toujours associés à ceux encodant l'histone H3 exprimés en orientation inverse, ce qui leur permet de partager un même promoteur. On trouve donc les gènes *h3.1/h4.1* sur le chromosome 1, et les gènes *h3.2/h4.2* ainsi que *h3.3/h4.3* localisés à distance sur le chromosome 2 (**Figure 15**). La mutation ponctuelle des trois copies de H4 étant lourde, voire irréaliste, nous avons opté pour une autre stratégie (voir ci-dessous). Le second problème vient du fait que 4 résidus sont acétylés et les 16 combinaisons possibles devraient donc être générées, ce qui est envisageable (Dion et al., 2005), mais irréaliste dans le cadre de la durée du mémoire. Nous basant sur le travail réalisé chez *S. cerevisiae* qui suggère que les résidus K5, K8 et K12 ont des fonctions apparentées additives différentes de celle de K16, nous avons planifié de générer le quadruple mutant K5-8-12-16R, le triple mutant K5-8-12R, et les simples mutants K5R et K16R. Le mutant K16R nous a été fourni par l'équipe de Songtao Jia qui l'a publié au

A.

1) Remplacement d' *ura4* par le gène synthétique

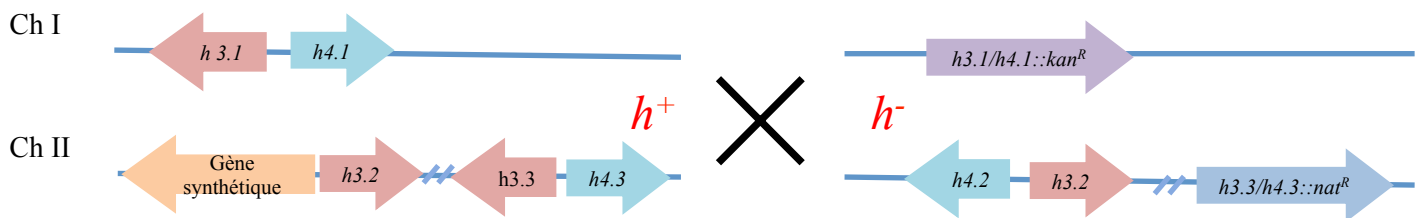


2) Sélection sur 5-FOA



B.

1) Croisement



2) Sélection sur milieux antibiotiques

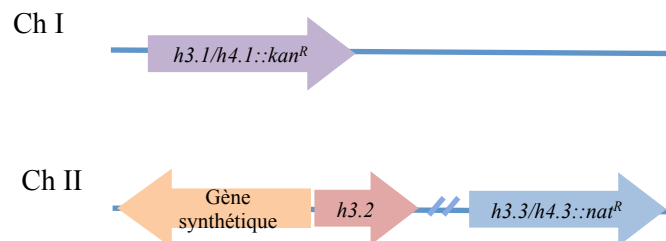


Figure 16

A : Insertion d'un des trois gènes synthétiques dans la souche *h4.2::ura4*.

La souche *h4.2::ura4* est transformée avec un des trois gènes synthétiques (*h4.2* K5R ; K5-8-12R ou K5-8-12-16R = KxR). La perte d'*ura4* est sélectionnée sur 5-FOA et un séquençage est ensuite réalisé sur les différents clones positifs pour vérifier l'insertion du KR au locus *h4.2*.

B : Croisement entre une souche ayant le gène synthétique et une souche délétée pour *h4.1* et *h4.3*.

Une souche *h4.2* KxR est croisée avec une autre souche délétée pour *h4.1* et *h4.3*. Le but est d'essayer d'obtenir une souche ayant les deux délétions pour *h4.1* et *h4.3* ainsi que la mutation KR au locus *h4.2*.

cours de notre travail (Wang et al., 2013). Dans les autres cas, la création du mutant repose sur l'utilisation d'un gène synthétique qui sera intégré au locus dans le génome.

1. Stratégie utilisée précédemment au laboratoire pour obtenir des mutants non acétylables de l'histone H3

L'étude de l'acétylation de l'histone H3 a été réalisée précédemment au laboratoire. La stratégie adoptée reposait sur une publication précédente (Mellone et al., 2003). Afin de muter un résidu spécifique de H3, les copies 1 et 3 sont délétées et la mutation désirée est insérée au niveau de la copie 2. Pratiquement, une souche sauvage est d'abord délétée pour générer *h3.1/h4.1::kanR*. Puis, le locus *h3.2* est délété par le marqueur *ura4* (*h3.2::ura4*). Ceci permet ensuite l'intégration d'un gène synthétique muté pour H3 par contre-sélection sur un milieu contenant du 5-FOA. En effet, le 5-FOA est toxique en présence du marqueur *ura4* et seuls les clones ayant intégrés le gène synthétique peuvent donc pousser. En parallèle, une autre souche est construite avec pour génotype *h3.3/h4.3::natR* et *h3.2::hphR* (qui donne la résistance à l'hygromycine). Finalement, les souches résultantes sont croisées et on sélectionne dans la descendance les spores qui sont résistantes à la généticine (*h3.1/h4.1::kanR*), à la nourséothricine (*h3.3/h4.3::natR*) mais sont sensibles à l'hygromycine car elle possède l'allèle synthétique intégré au locus 2 et non l'allèle délété (**Figure 15**). Nous avons dans un premier temps opté pour la même stratégie pour construire les mutants H4. La première étape consistant à créer une souche de génotype *h3.1/h4.1::kanR h4.2::ura4*. De manière inattendue, il a été impossible d'obtenir cette souche, ce qui suggère que la délétion simultanée des copies 1 et 2 de H4 est non viable, contrairement à celle des copies 1 et 2 de H3.

Nous avons dès lors adapté la méthode en créant une souche de génotype *h4.2::ura4* qui possèdent des copies sauvages au locus 1 et 3 (**Figure 16a**). Cette souche a permis d'intégrer les différents mutants. Les souches résultantes ont été croisées avec une souche de génotype *h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR* et nous avons sélectionné dans la descendance les spores possédant une délétion au locus 1 et 3 et le gène synthétique au locus 2. Il faut remarquer que le désavantage de cette stratégie par rapport à la précédente est l'absence de sélection possible au locus 2. Il faut donc séquencer les clones pour savoir si on a affaire au sauvage ou au mutant (**Figure 16b**).

a. Mutant K5R (**Tableau 2**)

Un croisement entre les souches de génotype *h4.2 K5R* et *h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR* est réalisé et suivi par une dissection de tétrades. Les colonies sont répliquées sur milieux YEK et YEN comme précédemment et la croissance observée. Le séquençage permet d'identifier les spores possédant l'allèle muté. Pour des raisons d'économie, toutes les tétrades n'ont pas été séquencées. La tétrade A montre un exemple de combinaisons parentales et la tétrade C montre une ségrégation plus complexe incluant notamment la combinaison recherchée, à savoir le mutant K5R (locus 2) présent simultanément avec les délétions des locus 1 et 3.

b. Mutant K5-8-12R (**Tableau 3**)

Une approche identique a été mise en place pour le triple mutant K5-8-12R. L'analyse révèle que la combinaison des mutations K5-8-12R au locus 2 avec la délétion des locus 1 et 3 est systématiquement létale, ce qui indique que la présence de lysines acétylables à ces positions est requise pour la viabilité. Typiquement la tétrade G montre une combinaison

| h4.2 K5R x h3.1/h4.1::kanR + h3.3/h4.3::natR | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|----|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|
| A | YES | + | + | + | + | D | YES | + | + | + | + |
| | YEN | - | + | + | - | | YEN | + | - | + | - |
| | YEK | - | + | + | - | | YEK | - | + | - | + |
| Séquençage | | K5R | WT | WT | K5R | | | | | | |
| B | YES | + | + | + | + | E | YES | + | + | + | + |
| | YEN | + | + | - | - | | YEN | + | - | - | + |
| | YEK | - | - | + | + | | YEK | - | + | + | - |
| | | | | | | | | | | | |
| C | YES | + | + | + | + | F | YES | + | + | + | + |
| | YEN | + | - | + | - | | YEN | - | + | + | - |
| | YEK | + | - | - | + | | YEK | + | - | - | + |
| Séquençage | | K5R | WT | K5R | WT | | | | | | |

Tableau 2: Dissection de tétrades du croisement *h4.2 K5R x h3.1/h4.1::kanR + h3.3/h4.3::natR*

Chaque lettre (A à F) correspond à une tétrade disséquée. Les tétrades sont étalées sur milieu riche (YES) puis répliquées sur milieu antibiotique : Nourséothricine (YEN) ou Kanamycine (YEK). La souche parentale est délétée via une cassette Kan pour le locus *h4.1* et une cassette Nat pour le locus *h4.3*. L'insertion du gène synthétique est vérifiée par séquençage.
 (+ : la colonie pousse ; - : la colonie ne pousse pas)

| h4.2 K5-8-12R x h3.1/h4.1::kanR + h3.3/h4.3::natR | | | | | | | | | | | |
|---|-----|----------|-------|----------|----------|------------|-----|----------|----------|-------|-------|
| A | YES | + | + | + | + | F | YES | - | + | + | + |
| | YEN | + | + | - | - | | YEN | - | + | - | - |
| | YEK | - | + | - | + | | YEK | - | - | - | + |
| Séquençage | | K5-8-12R | WT | WT | K5-8-12R | Séquençage | | létal | K5-8-12R | WT | WT |
| B | YES | + | - | - | + | G | YES | + | + | - | + |
| | YEN | - | - | - | - | | YEN | - | - | - | + |
| | YEK | - | - | - | - | | YEK | - | - | - | + |
| Séquençage | | WT | létal | létal | WT | Séquençage | | K5-8-12R | WT | létal | WT |
| C | YES | + | - | + | + | H | YES | + | + | + | + |
| | YEN | - | - | + | + | | YEN | - | - | + | + |
| | YEK | + | - | - | - | | YEK | - | + | + | - |
| Séquençage | | K5-8-12R | | WT | WT | Séquençage | | WT | K5-8-12R | WT | WT |
| D | YES | + | - | + | + | I | YES | + | + | + | - |
| | YEN | - | - | - | + | | YEN | - | + | - | - |
| | YEK | + | - | + | - | | YEK | - | - | + | - |
| Séquençage | | | létal | WT | WT | Séquençage | | K5-8-12R | WT | WT | létal |
| E | YES | + | + | + | + | | | | | | |
| | YEN | + | - | - | + | | | | | | |
| | YEK | - | + | + | - | | | | | | |
| Séquençage | | K5-8-12R | WT | K5-8-12R | WT | | | | | | |

Tableau 3 : Dissection de tétrades du croisement *h4.2* K5-8-12R x *h3.1/h4.1::kanR* + *h3.3/h4.3::natR*

Chaque lettre (A à I) correspond à une tétrade disséquée. Les tétrades sont étalées sur milieu riche (YES) puis répliquées sur milieu antibiotique : Nourséothricine (YEN) ou Kanamycine (YEK). La souche parentale est délétée via une cassette Kan pour le locus *h4.1* et une cassette Nat pour le locus *h4.3*. L'insertion du gène synthétique est vérifiée par séquençage.

(+ : la colonie pousse ; - : la colonie ne pousse pas)

| h4.2 K5-8-12-16R x h3.1/h4.1::kanR + h3.3/h4.3::natR | | | | | |
|--|-----|-------------|----|-------------|-------------|
| A | YES | + | + | + | + |
| | YEN | + | + | - | - |
| | YEK | - | + | - | - |
| Séquençage | | WT | WT | K5-8-12-16R | K5-8-12-16R |
| B | YES | + | + | - | + |
| | YEN | + | - | - | + |
| | YEK | - | - | - | + |
| Séquençage | | K5-8-12-16R | WT | léta | WT |
| C | YES | - | + | + | + |
| | YEN | - | - | - | - |
| | YEK | - | - | + | + |
| Séquençage | | léta | WT | WT | K5-8-12-16R |
| D | YES | - | + | + | + |
| | YEN | - | - | + | + |
| | YEK | - | - | - | + |
| Séquençage | | léta | WT | K5-8-12-16R | WT |

Tableau 4 : Dissection de tétrades du croisement *h4.2 K5-8-12-16R x h3.1/h4.1::kanR + h3.3/h4.3::natR*

Chaque lettre (A à D) correspond à une tétrade disséquée. Les tétrades sont étalées sur milieu riche (YES) puis répliquées sur milieu antibiotique : Nourséothricine (YEN) ou Kanamycine (YEK). La souche parentale est délétée via une cassette Kan pour le locus *h4.1* et une cassette Nat pour le locus *h4.3*. L'insertion du gène synthétique est vérifiée par séquençage.

(+ : la colonie pousse ; - : la colonie ne pousse pas)

viable possédant les copies 1 et 3 délétées et une combinaison létale dont le génotype déduit est *h4.2 K5-8-12R h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR*.

c. Mutants K5-8-12-16R (**Tableau 4**)

Le croisement entre les deux souches parentales n'a pas bien fonctionné, probablement parce que le quadruple mutant est semi-dominant sur les deux copies sauvages et déjà fortement affecté. Par rapport aux autres dissections de tétrades, ce croisement-ci présente donc moins de tétrades testées. Les spores étant positives pour les deux milieux sélectifs s'avèrent également WT pour le locus *h4.2* (tétrades B et D). Tandis que les autres spores sont létales (tétrades B, C et D). La mutation K5-8-12-16R est donc létale pour *S. pombe*, comme attendu puisque le triple mutant était déjà non viable.

Les croisements impliquant les mutants K5-8-12R et K5-8-12-16R s'étant avérés plus délicats, nous les avons répétés en RSA pour cribler un plus grand nombre de colonies. Une série de clones présentant une croissance sur milieux supplémentés par de la généticine et de la nouséothricine (et donc possédant le génotype *h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR*) ont été séquencés au niveau de la copie 2 de l'histone H4. Tous les clones séquencés possédaient une copie sauvage au locus 2. Ceci conforte la conclusion que l'insertion d'une copie synthétique non-acétylable pour les lysines 5-8-12 ou 5-8-12-16 du gène de l'histone H4 en plus de la délétion pour *h4.1* et *h4.3* est létale pour la levure *S. pombe*.

2. Semi-dominance des allèles *h4.2 K5-8-12R* et *h4.2 K5-8-12-16R*

Pour maximiser nos chances d'obtenir les mutants, nous avons mis en place une seconde stratégie en parallèle de celle décrite à la **Figure 16**. Comme montré à la **Figure 17**, cette stratégie est similaire si ce n'est que les mutants sont intégrés dans une souche de génotype *h4.2::ura4 h3.3/h4.3::natR*. Après intégration des mutants au locus 2, nous avons de ce fait disposé de souches possédant une copie sauvage au locus 1, une copie délétée au locus 3 et les mutants au locus 2. Il est apparu très clairement que dans ce contexte, le mutant K5-8-12R et surtout le mutant K5-8-12-16R sont semi-dominants et fortement affectés pour leur croissance, présentant des phénotypes allongés avec des septa mal positionnés (**Figure 18**). Ces observations suggèrent que l'absence d'acétylation de H4 pourrait résulter en problèmes de ségrégations mitotiques, ce qui expliquerait la létalité de ces souches quand la seule copie mutée est présente. Nous avons d'ailleurs noté que le phénotype terminal des spores (**Tableaux 3 et 4**) exprimant ces mutants comme seule version de H4 était similaire à ce qui est observé à la **Figure 18** (donnée non montrée).

F. Etude de l'acétylation de l'histone H4 sur les résidus K5, K8, K12 et K16 avec des souches non-acétylables

La création de mutants non acétylables donnent l'opportunité de tester la spécificité des anticorps utilisés pour les western-blots de la **Figure 19**. Des extraits protéiques totaux ont été préparés et séparés par PAGE. Après transfert sur membrane, les anticorps spécifiques des lysines 5, 8, 12 et 16 acétylées ont été utilisés pour la détection. Notons qu'une souche de génotype *h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR* est utilisée comme contrôle puisque que c'est le background génétique des mutants K5R et K16R.

Malgré un chargement inégal révélé par la détection de la tubuline, il est clair que le signal de l'anti K5-ac est presque totalement éliminé dans le mutant K5R, indiquant une très bonne spécificité de celui-ci. Par contre, le mutant K16R donne toujours un signal équivalent

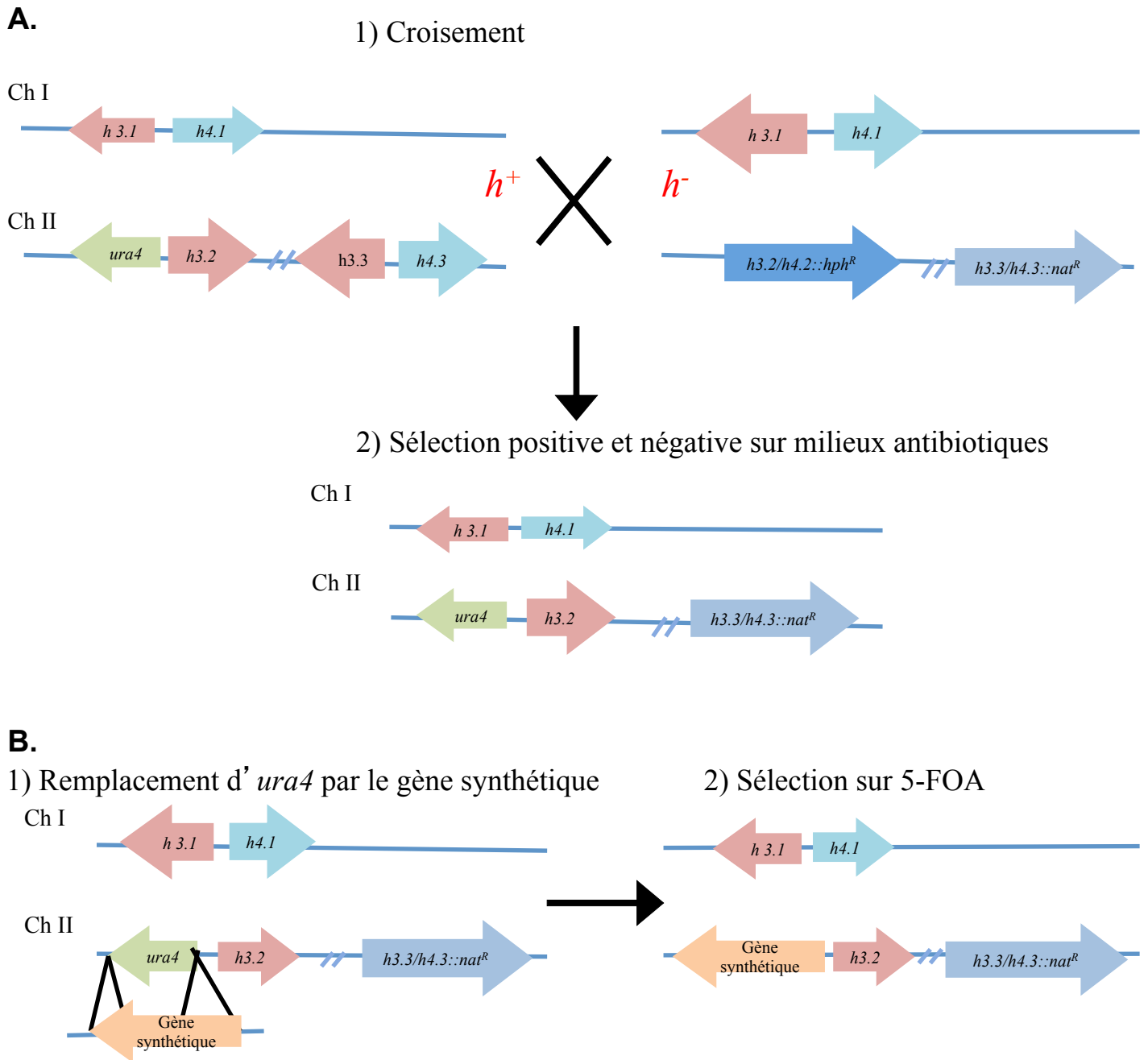


Figure 17

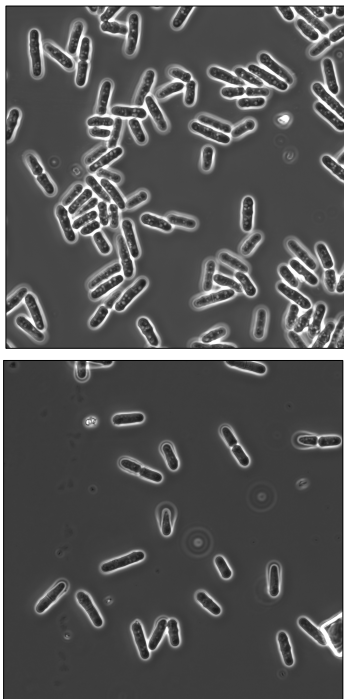
A : Création d' une souche ayant *ura4* au locus *h4.2* et une délétion au locus *h4.3*.

Un croisement entre la souche *h4.2::ura4* avec une souche délétée pour *h4.2* et *h4.3* est réalisé. Le but est d' obtenir une souche délétée pour *h4.3* et *h4.2::ura4*.

B : Insertion d' un des trois gènes synthétiques au locus *h4.2* dans une souche délétée pour *h4.3*.

La souche *h4.2::ura4* et délétée pour *h4.3* est transformée avec un des trois gènes synthétiques. Les souches ayant potentiellement le gène synthétique sont sélectionnées sur 5-FOA et elles sont ensuite séquencées pour vérifier l' intégration du KR.

A. *h3.3/h4.3::natR*



B. *h4.2 K5-8-12-16R h3.3/h4.3::natR*

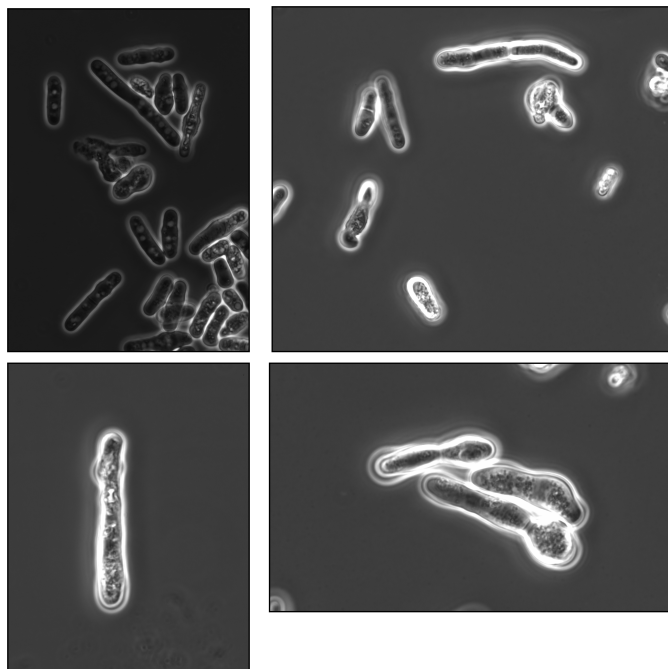


Figure 18 : Phénotype semi-dominant du quadruple mutant intégré au locus 2 dans un background où le locus 3 est délété .

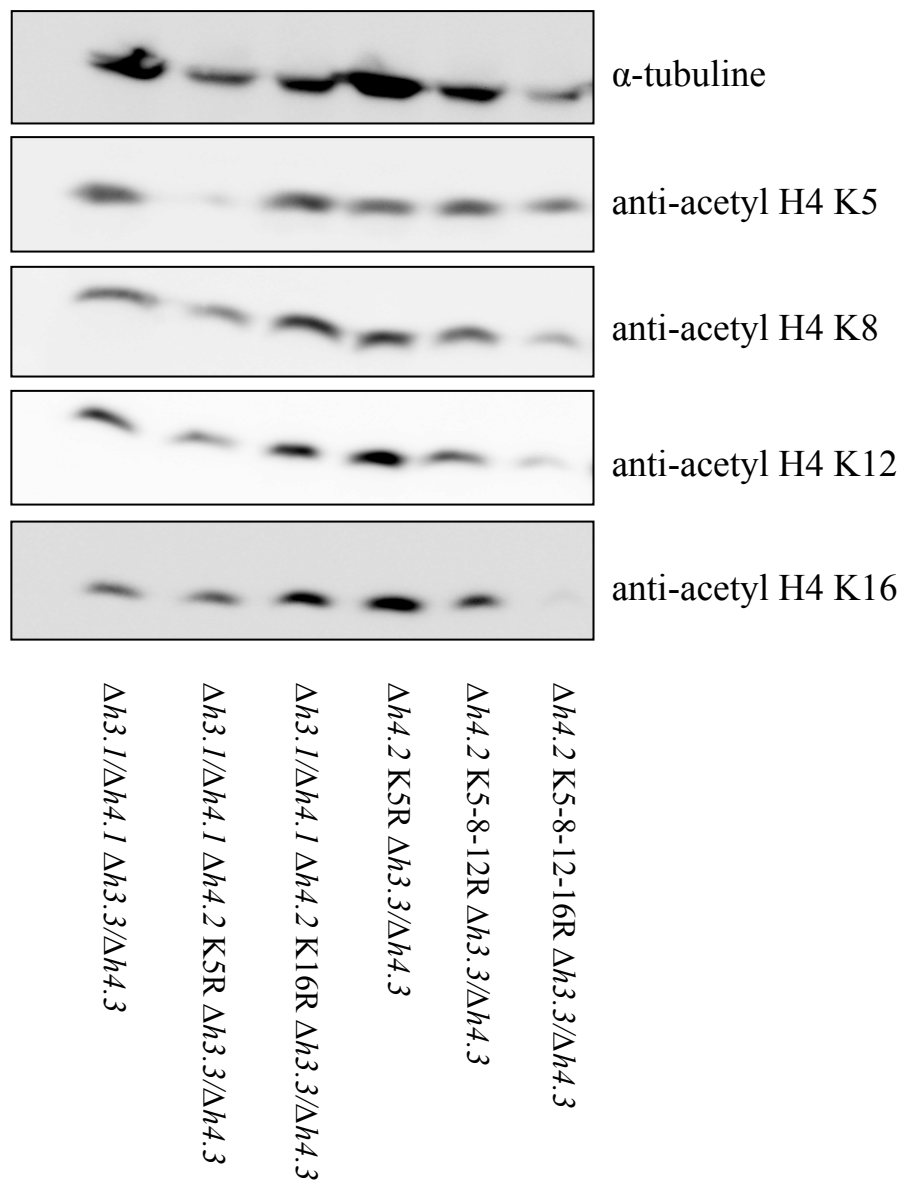


Figure 19 : L'acétylation de l'histone H4 pour différentes souches non-acétylables.

Plusieurs anticorps anti-acétyles, ciblant une lysine acétylable à la fois de l'histone H4, sont utilisés pour évaluer l'acétylation. Les souches $\Delta h3.1/\Delta h4.1 \Delta h3.3/\Delta h4.3$, $\Delta h3.1/\Delta h4.1 \Delta h4.2$ K5R $\Delta h3.3/\Delta h4.3$, $\Delta h3.1/\Delta h4.1 \Delta h4.2$ K16R $\Delta h3.3/\Delta h4.3$, $\Delta h4.2$ K5R $\Delta h3.3/\Delta h4.3$, $\Delta h4.2$ K5-8-12R $\Delta h3.3/\Delta h4.3$, $\Delta h4.2$ K5-8-12-16R et $\Delta h3.3/\Delta h4.3$ sont analysées sur un gel pré-coulé de 8-16%. Un anticorps anti- α -tubuline est utilisé comme contrôle de chargement. (H4 ~ 11,42 kDa et α -tubuline ~ 50 kDa).

au contrôle avec l'anti-K16-ac, suggérant que cet anticorps n'est pas spécifique de K16 mais peut aussi reconnaître une ou plusieurs autres lysines.

Comme indiqué plus haut, nous avons aussi généré des mutants possédant une copie 1 sauvage et une copie 3 délétée. Ils ont été testés dans le même western-blot. Il faut noter qu'une souche de génotype *h3.3/h4.3::natR* serait adéquate comme contrôle. Elle n'a pu être générée par manque de temps.

Le mutant K5-8-12R, délété pour la copie 3, présente une acétylation moins importante pour les quatre lysines. Le mutant K5-8-12-16R, délété pour la copie 3, montre une diminution en gradient de l'acétylation de l'histone H4. Le gradient décrit une intensité décroissante allant de la lysine 5 à la lysine 16. Notons que le dernier mutant pousse très mal, rendant son analyse en western-blot difficile.

Nous concluons que les mutants H4 K5R et H4 K16R sont viables chez *S. pombe* et ne présentent pas de défaut de croissance particulier. L'anticorps anti-K5-ac est bien spécifique alors que l'anti-K16-ac reconnaît probablement d'autres lysines, en tous cas dans le contexte du mutant K16R.

Les mutants K5-8-12R et K5-8-12-16R sont non viables et semi-dominants sur une copie sauvage. Les phénotypes apparents suggèrent un problème mitotique, peut-être lors de la condensation des chromosomes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

V. Discussion et perspectives

Chez les eucaryotes, l'ADN génomique est empaqueté avec les protéines histones sous forme de chromatine. La chromatine régule tous les processus qui impliquent l'ADN, à savoir la transcription, la recombinaison ou la réparation. Sur base de son niveau de compaction, la chromatine est classée en euchromatine ou hétérochromatine. Ces deux états bien que fonctionnellement opposés peuvent dans une certaine mesure être interchangeables et l'hétérochromatine a la capacité de se propager (spreading) pour inactiver la transcription parfois sur de grandes distances (Grewal and Jia, 2007). L'hétérochromatine se caractérise notamment par la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9-me) et une hypoacétylation globale. Chez la levure *S. cerevisiae*, il est établi que la déacétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) par les protéines Sir2 et Sir4 jouent un rôle clé dans la formation et la propagation d'hétérochromatine (Moazed, 2011), mais il faut souligner que *S. cerevisiae* se démarque de la grande majorité des eucaryotes par la perte de H3K9-me, ce qui rendait la conservation du rôle de H4K16 incertaine jusqu'il y a peu (Wang et al., 2013). En effet, au cours de ce travail, il a été rapporté que la protéine anti-spreading Bdf2 reconnaît H4K16-ac chez *S. pombe* et que l'acétylation de la lysine 16 joue un rôle mécaniquement différent mais fonctionnellement similaire chez les deux levures (Wang et al., 2013). Le décodage de la relevance biologique de l'acétylation de H4, au delà du résidu 16 devrait permettre de mieux comprendre le rôle de cette protéine histone dans l'activité chromatidienne. Une étude à large échelle chez *S. cerevisiae* a révélé que les lysines 5, 8 et 12 ont des fonctions cumulatives différentes de la lysine 16. Étonnamment, seul le quadruple mutant est létale, ce qui suggère que les fonctions des 4 lysines sont quand même, d'une manière ou d'une autre, apparentées (Dion et al., 2005). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail.

Nos données montrent que l'inactivation individuelle des 3 histone acétyltransférases (HAT) connues chez *S. pombe* (NuA3, NuA4 et SAGA) ne permet pas d'abolir l'acétylation de H4, ce qui suggère une forme de redondance. La délétion du gène *png1*, qui encode une sous unité du complexe NuA4 montre cependant une diminution significative de l'acétylation de l'histone H4 au niveau de toutes les lysines acétylables de l'histone H4 à l'exception de la lysine 5. Cependant, dans la littérature, l'acétylation de la lysine 5 est également réduite dans ce même mutant (Chen et al., 2010). Une différence de « background » génétique pourrait peut-être être la cause de cette inconsistance. Dans ce mémoire, la souche est uniquement délétée pour *png1* alors que dans l'étude décrite, la souche $\Delta png1$ contient différents marqueurs d'auxotrophie (*ade6*, *leu1*, *his7*, *ura4-D18*) (Chen et al., 2010). Les deux souches ne sont donc pas rigoureusement identiques ce qui peut parfois donner lieu à des variations de résultats. Quoi qu'il en soit, ces données suggèrent que le complexe NuA4 est bien impliqué dans l'acétylation de H4 *in vivo*.

A l'inverse du mutant *png1*, lorsque la protéine Mst1, la sous-unité catalytique essentielle du complexe NuA4, est inactivée, cela a peu d'effet sur l'acétylation d'H4. La souche *mst1-ts* utilisée dans cette étude est, comme son nom l'indique, thermosensible ce qui pose peut-être problème. Le mutant *mst1-ts* ne serait éventuellement pas thermolétal, ce qui expliquerait la persistance d'acétylation de l'histone H4 après le choc thermique. Dans l'étude du groupe de Forsburg qui a construit ce mutant, la croissance de *mst1-ts* est fortement affectée à température restrictive (Gomez et al., 2008). Ceci indique que le choc thermique a bien un effet déstabilisant sur la protéine Mst1 mais cette étude ne regarde pas l'acétylation de l'histone H4 (Gomez et al., 2008). Le défaut de croissance de cette souche pourrait donc

résulter du défaut d'acétylation d'un autre substrat, non histone. Nous proposons l'hypothèse que Mst1, associée à Png1 participe à l'acétylation de H4 mais qu'une autre (ou plusieurs) HAT y contribue également. Par ailleurs, Mst1 serait aussi impliquée, indépendamment de Png1, dans l'acétylation essentielle d'une protéine X. L'inactivation partielle de la protéine dans la souche *ts* masquant quelques peu l'effet sur H4. Cette hypothèse est confortée par le fait que Mst1 joue également d'autres rôles et lie différentes protéines lors de la transcription et réplication de l'ADN (Gomez et al., 2008). Mst1 contribue également à la réponse aux dommages à l'ADN. Cette contribution se fait selon deux voies : en affectant la réparation de l'ADN à travers la modification des histones qui recrute différentes protéines spécifiques à la réparation ; et la réponse de plusieurs points de contrôle (checkpoint) à travers la modification de p53 et d'ATM (Gomez et al., 2008). Pourtant, dans la littérature, Mst1 est considérée comme l'HAT principale de l'histone H4 (Allis et al., 2007; Shahbazian and Grunstein, 2007) principalement sur base du travail effectué chez *S. cerevisiae* (Allard et al., 1999; Galarneau et al., 2000). Chez *S. pombe*, aucune étude n'a été réalisée pour confirmer que Mst1 acétylait l'histone H4.

Aucune diminution de l'acétylation n'est observée pour les simples mutants *mst2* et *gcn5*. Les deux HATs NuA3 et SAGA n'affectent donc pas l'acétylation de l'histone H4 individuellement mais il y a certainement une redondance entre les deux car le double mutant montre une diminution d'acétylation pour l'histone H4. Mst2 et Gcn5 participeraient donc de manière redondante à l'acétylation de H4. De manière remarquable, le double mutant *png1/gcn5* s'est avéré létal après une dissection de tétrades, alors que le double mutant *png1/mst2* reste viable et présente une acétylation réduite mais pas abolie sur H4. Sur base de l'analyse génétique, nous proposons que Gcn5 et Mst1-Png1 sont les HATs principales de H4. La co-létalité s'explique par le fait que l'acétylation d'un certain nombre de lysines (et peut-être une seule) est essentielle chez *S. pombe* comme nous l'avons démontré au cours de ce travail. La contribution possible de Mst2 ne suffit pas à garantir la survie. Les données obtenues avec le triple mutant *gcn5/mst2/mst1-ts* sont en accord avec ce qui précède.

Le contrôle de chargement avec l'anticorps anti-H4 total n'a pas fonctionné. Les raisons pour lesquelles l'anti-H4 ne fonctionne pas peuvent être de différents ordres. Normalement, cet anticorps doit fonctionner car il a été utilisé dans une étude précédente (Chen et al., 2010). Le problème viendrait peut-être d'un mauvais « batch » fourni par la firme. Le temps manquant, un nouvel anticorps anti-H4 total n'a pas été recommandé pour confirmer cette hypothèse. Celui-ci a donc été remplacé par l'anticorps anti-tubuline. La tubuline est traditionnellement utilisée car sa concentration est constante dans la plupart des conditions.

Un triple et quadruple mutant (K5-8-12R ou K5-8-12-16R), délétés pour la copie 1 et 3, sont létaux pour la levure *S. pombe*. Chez *S. cerevisiae*, seul le quadruple mutant n'est pas viable (Dion et al., 2005). Il faut insister sur le fait que la viabilité des mutants n'implique pas que l'acétylation n'est pas importante, simplement elle n'est pas essentielle dans les conditions idéales du laboratoire. A ce titre, il a été rapporté que le double mutant H4 K5-8R montre par exemple une réplication de l'ADN plus lente en comparaison avec une souche WT (Megee et al., 1990).

Chez *S. pombe*, Le mutant ayant l'insertion K5R ou K16R au locus *h4.2* est viable, l'acétylation d'une de ces deux lysines n'est donc pas essentielle à la levure de fission. Les mutations K8R et K12R, seules ou combinées devraient être réalisées, ce qui nous permettrait

de constater s'il y a une quelconque létalité et un effet de redondance lorsqu'une de ces deux lysines est mutée.

Les souches *h4.2* K5R et K16R, délétées pour les locus *h4.1* et *h4.3*, ont servi de contrôles pour les anticorps anti-acétyl d'une lysine spécifique. Le mutant K5R, délété pour la copie 1 et 3, n'a presque plus aucune bande d'acétylation pour l'anticorps anti-acétyl H4 K5. L'anticorps H4 K5-ac est donc spécifique malgré une très faible détection encore apparente pour le mutant K5R. Celle-ci peut être due au « background » ou au fait que l'anticorps reconnaît légèrement les autres lysines acétylées de l'histone H4, celles-ci étant très proches et de facto dans un contexte similaire. Le mutant K16R présente encore une bande acétylée quand l'anticorps anti-K16-ac est utilisé, ce qui suggère que l'anticorps n'est pas spécifique. La souche K16R, bien qu'avérée, sera retestée pour confirmer son génotype. Les souches *h4.2* K8R et K12R également délétées pour les deux autres loci (*h4.1* et *h4.2*) devraient être réalisées pour permettre de pouvoir confirmer que les deux autres anticorps utilisés sont bien spécifiques.

Le quadruple mutant (K5-8-12-16R), est déjà fortement affecté au niveau de sa croissance même en présence d'une copie sauvage au locus 1. Le phénotype indique que l'acétylation de l'histone H4 aurait un effet sur le cycle cellulaire et particulièrement la mitose de *S. pombe* comme en témoignent les cellules allongées et les septa mal positionnés observés. Une analyse plus fine avec coloration spécifique sera nécessaire pour explorer ces aspects de manière plus détaillée.

Dans le cadre de l'intérêt du laboratoire pour le rôle de l'acétylation des histones pendant la différenciation sexuelle de *S. pombe*, notre travail a généré de nouveaux mutants qui pourront être testés dans ce contexte pour établir un rôle de l'acétylation de H4.

MATERIEL ET METHODES

VI. Matériel et méthodes

A. Souches utilisées

| Génotype | Source |
|---|-----------------|
| h^+ wild-type | Laboratoire |
| h^- wild-type | P. Nurse (2001) |
| h^{90} wild-type | P. Nurse (2009) |
| h^{90} <i>gcn5::kanR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>mst2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>mst1::ura4 nmt1-mst1 L344S</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>mst2::ura4 mst1::kanR nmt1-mst1 L344S</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>png1::kanR</i> | Laboratoire |
| h^{90} <i>png1::kanR</i> | Laboratoire |
| h^- <i>png1::kanR</i> | Laboratoire |
| h^- <i>gcn5::natR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>gcn5::natR mst2::ura4 mst1::kanR nmt1-mst1 L344S</i> | Laboratoire |
| h^- <i>png1::kanR mst2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>png1::kanR mst2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^{90} <i>gcn5::kanR mst2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^{90} <i>h3.1/h4.1::kanR</i> | Laboratoire |
| h^{90} <i>h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h3.1/h4.1::kanR h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h3.3/h4.3::natR h3.2/h4.2::hphR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h4.2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h4.2::ura4</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h4.2::ura4 h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h4.2 K5R (wt h4.1 and h4.3)</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h4.2 K5-8-12R (wt h4.1 and h4.3)</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h4.2 K5-8-12-16R (wt h4.1 and h4.3)</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h3.1/h4.1::his3 h4.2 K16R h3.3/h4.3::arg3</i> | S. Jia (2013) |
| h^- <i>h4.2 K5R h3.3/h4.3::natR (wt h4.1)</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h4.2 K5-8-12R h3.3/h4.3::natR (wt h4.1)</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h4.2 K5-8-12-16R h3.3/h4.3::natR (wt h4.1)</i> | Laboratoire |
| h^- <i>h3.1/h4.1::kanR h4.2 K16 R h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |
| h^+ <i>h3.1/h4.1::kanR h4.2 K5R h3.3/h4.3::natR</i> | Laboratoire |

Table n°1 : Liste des souches de *S. pombe* utilisées lors de cette étude.

B. Oligonucléotides

| Séquences Forward 5' → 3' | Cible |
|---------------------------|--------------------|
| TTAACCACCGAAACCATAAATGG | <i>h3.1/h4.1</i> |
| AATTGCATTTCTTCAAGGAAAACC | <i>h3.2/h4.2</i> |
| TTATGAGCGTTCACCGCG | <i>h3.3/h4.3</i> |
| AAATGAAGTATTTTGCGAAACGTG | $\Delta h3.1/h4.1$ |
| CAAAAAATCAAATACGGTCAACCC | $\Delta h3.3/h4.3$ |

| | |
|----------------------------------|------------------|
| GCGTATTGGATATACTGGTCTTTG | <i>ura4</i> |
| TAAGTCAGACACAAGGTTGGG | $\Delta h3.2$ |
| GGAAGCCGAAATCGCAATC | <i>h3.2/h4.2</i> |
| TTTTCGTGCTCGTTTCATCTTG | <i>gcn5</i> |
| AGGAAGCTACCAACTTAGGTG | <i>png1</i> |
| CAGCGTCTAGCGTTTTTCATAT | <i>png1</i> |
| CTTGAACATTTCAGCGGTATCG | <i>gcn5</i> |
| AGGGTTATCTTTGCAGAGATCG | <i>mst2</i> |
| Séquences Reverse 5' → 3' | |
| TTATGAGCGTTCGCCACG | <i>h3.1/h4.1</i> |
| GGCAATCAATGCATTTAAGAGC | <i>h3.2/h4.2</i> |
| CGGAGTCGGCAATTGATATCG | <i>h3.3/h4.3</i> |
| CGGATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAGC | hphR, natR, kanR |
| CGCAAACAAGGCATCGAC | <i>ura4</i> |
| CGTAACATTGCCAGTAAGTAAG | <i>ura4</i> |
| CAAGGAGGGTATTCTGGGCC | hphR, natR, kanR |
| GACTTACAGTAGCAGGCGGTC | $\Delta h3.2$ |
| CTGTGGTTAGCTACGGCGTG | <i>png1</i> |
| CCATCAACCCAGGAACTTGAG | <i>gcn5</i> |
| CGACCAGCTATAAAGCCAAAGC | <i>ura4</i> |
| Mating type | |
| AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG | MT1 |
| ACGGTAGTCATCGGTCTTCC | MP |
| TACGTTCACTAGACGTAGTG | MM |

Table n°2 : Liste des différentes amorces utilisées lors de cette étude.

C. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

YES (Yeast Extract Supplemented) : milieu riche non synthétique.

EMM broth (Edinburgh Minimal Medium) : milieu minimum synthétique

ME (Malt Extract) : milieu pauvre en azote utilisé pour les croisements.

Pour les milieux solides, 2% d'agar FormediumTM sont ajoutés pour chacun des milieux.

Les antibiotiques utilisés sont :

Généticine (YEK)

Nourséothricine (YEN)

Hygromycine (YEH)

à une concentration de 100 mg/ml.

Le 5-FOA (5 fluoroorotic acid) est également utilisé (1 mg/ml).

D. Croisements

Les croisements sont réalisés en mélangeant deux souches de mating types opposés sur ME Agar. La présence de spores est détectée après 2-3 jours. Elles peuvent ensuite être analysées par « random spore analysis » ou par dissection de tétrades.

1. « Random Spore Analysis »

Après croisement, un loop de cellules est placé à 25°C O/N dans 200 µl d'eau stérile avec 1,5 µl d'hélicase. Les cellules sont lavées dans 800 µl de SDS 1%. 100 µl d'une dilution adéquate sont étalés sur milieu riche. Après deux ou trois jours, les boîtes sont répliquées sur milieu sélectif.

2. Dissection de tétrades

Après croisement, les tétrades sont isolées à l'aide d'un micromanipulateur (Singer instruments MSM system). Ensuite, elles sont incubées pendant environ 4 heures à 32 °C. Les quatre spores sont alors séparées les unes des autres. Ensuite, elles sont incubées à 32 °C jusqu'à l'apparition des colonies.

E. Mise en évidence des protéines

1. Extraction de protéines

Un volume de culture équivalent à 10 ml x DO 0,5 en phase exponentielle est culoté puis resuspendu dans 1 ml d'eau puis dans 100 µl de NP40 à 4 °C. L'échantillon est bouilli à 100°C pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lysées au FAST PREP et le lysat est récupéré.

2. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant

Des gels AmershamTM précolés de 8-16% sont utilisés.

20 µl d'extraits protéiques mélangés à du tampon de chargement sont chargés par puits.

3. Transfert sur membrane de PVDF (Western Blot)

Les protéines sont transférées du gel sur une membrane PVDF préalablement activée au méthanol. Le transfert a lieu pendant une heure avec une intensité de 0,8 mA/cm².

4. Immunodétection

La membrane est bloquée dans du lait + PBS tween.

Plusieurs anticorps primaires sont ensuite utilisés :

Anti-acétyl H4 K5-8-12-16 : Millipore 05-1355

Anti-acétyl H4 set (K5, K8, K12 et K16) : Millipore 17-211

Anti-tubuline : Sigma T5168

Anti-H4 total : Millipore 07-108

Un des anticorps secondaires correspondant est utilisé :
Anti-souris : Rockland 610-631-002
Anti-lapins : Molecular Probes® 02-764

L'ECL (Amersham Pharmacia Biotech) est ajouté à la membrane et cette dernière est révélée par un ImageQuant LAS4000.

F. Transformation de *S. pombe*

Un volume de culture équivalant à 10 ml à DO 0,5 en phase exponentielle est utilisé. Les levures sont transformées par une procédure à l'acétate de lithium. Un choc thermique est réalisé pour que l'ADN linéaire, qui a été préalablement amplifié par PCR, puisse entrer dans la cellule. Finalement, les cellules transformées sont étalées sur YES. Après une nuit, les boîtes sont répliquées sur milieu sélectif.

G. PCR sur colonie

La PCR est réalisée avec une polymérase Go-Taq® de la firme Promega.

| Programme PCR : | | |
|-------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 100°C | 10 minutes | Lyse des cellules |
| 94°C | 4 minutes | Déshybridation des deux brins d'ADN |
| | | Ajout de la Go-Taq polymérase |
| 94°C | 45 secondes | Dénaturation |
| TM – 3 °C | 30 secondes | Hybridation des primers |
| 72 °C | X minutes (X = 1 min/kb) | Elongation via Go-Taq |
| → 34x à l'étape 3 | | |
| 72 °C | 10 minutes | Finalisation |

H. PCR « expand »

La PCR « expand » est également utilisée.

| Programme PCR : | | |
|-------------------|-------------|--|
| 94 °C | 2 minutes | Déshybridation des deux brins d'ADN |
| 94 °C | 30 secondes | |
| 50 °C | 1 minute | Hybridation des primers |
| 68 °C | 3 minutes | Elongation via Expand polymérase (Roche) |
| → 8x à l'étape 2 | | |
| 94 °C | 30 secondes | Déshybridation |
| 58 °C | 1 minute | Hybridation |
| 68 °C | 3 minutes | Elongation |
| → 34x à l'étape 6 | | |
| 68 °C | 10 minutes | Finalisation |

I. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR sont ensuite placés sur un gel d'agarose 1 %.

J. Purification de produits PCR

Les fragments d'ADN sont purifiés pour réaliser une transformation ou pour être envoyés au séquençage. Deux kits sont utilisés :

- QIAquick PCR purification kit (Quiagen) → transformation
- MSB[®] Spin PCRapace (Invisorb) → Séquençage (Beckman Cogenics)

BIBLIOGRAPHIE

VII. Bibliographie

- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *The EMBO journal* 18, 5108-5119.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhata, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.
- Aygun, O., and Grewal, S.I. (2010). Assembly and functions of heterochromatin in the fission yeast genome. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 75, 259-267.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology* 8, 227.
- Buratowski, S., and Kim, T. (2010). The role of cotranscriptional histone methylations. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 75, 95-102.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends in genetics : TIG* 19, 321-329.
- Chen, J.Q., Li, Y., Pan, X., Lei, B.K., Chang, C., Liu, Z.X., and Lu, H. (2010). The fission yeast inhibitor of growth (ING) protein Png1p functions in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 285, 15786-15793.
- Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074-1079.
- Coudreuse, D., van Bakel, H., Dewez, M., Soutourina, J., Parnell, T., Vandenhoute, J., Cairns, B., Werner, M., and Hermand, D. (2010). A gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation for sexual differentiation in *S. pombe*. *Current biology : CB* 20, 1053-1064.
- Dion, M.F., Altschuler, S.J., Wu, L.F., and Rando, O.J. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5501-5506.
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., and Cote, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Molecular cell* 5, 927-937.
- Gomez, E.B., Nugent, R.L., Laria, S., and Forsburg, S.L. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* histone acetyltransferase Mst1 (KAT5) is an essential protein required for damage response and chromosome segregation. *Genetics* 179, 757-771.
- Goto, D.B., and Nakayama, J. (2012). RNA and epigenetic silencing: insight from fission yeast. *Development, growth & differentiation* 54, 129-141.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.
- Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., Swaney, D.L., Gygi, S.P., Bahler, J., and Winston, F. (2011). Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex. *The EMBO journal* 30, 2843-2852.
- Hennig, B.P., and Fischer, T. (2013). The great repression: Chromatin and cryptic transcription. *Transcription* 4.
- Jacquier, A. (2009). The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet* 10, 833-844.
- Jensen, T.H., Jacquier, A., and Libri, D. (2013). Dealing with pervasive transcription. *Molecular cell* 52, 473-484.

- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., and Kusch, T. (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends in biochemical sciences* 30, 680-687.
- Keller, C., and Buhler, M. (2013). Chromatin-associated ncRNA activities. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 21, 627-641.
- Kim, H.S., Vanoosthuyse, V., Fillingham, J., Roguev, A., Watt, S., Kislinger, T., Treyer, A., Carpenter, L.R., Bennett, C.S., Emili, A., *et al.* (2009). An acetylated form of histone H2A.Z regulates chromosome architecture in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature structural & molecular biology* 16, 1286-1293.
- Korber, P. (2012). Active nucleosome positioning beyond intrinsic biophysics is revealed by in vitro reconstitution. *Biochemical Society transactions* 40, 377-382.
- Koutelou, E., Hirsch, C.L., and Dent, S.Y. (2010). Multiple faces of the SAGA complex. *Current opinion in cell biology* 22, 374-382.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S., and Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117, 721-733.
- Larschan, E., and Winston, F. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Molecular and cellular biology* 25, 114-123.
- Lucchini, R., and Sogo, J.M. (1995). Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature* 374, 276-280.
- Ma, X.J., Wu, J., Altheim, B.A., Schultz, M.C., and Grunstein, M. (1998). Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6693-6698.
- Megee, P.C., Morgan, B.A., Mittman, B.A., and Smith, M.M. (1990). Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* 247, 841-845.
- Mellone, B.G., Ball, L., Suka, N., Grunstein, M.R., Partridge, J.F., and Allshire, R.C. (2003). Centromere silencing and function in fission yeast is governed by the amino terminus of histone H3. *Current biology : CB* 13, 1748-1757.
- Moazed, D. (2011). Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146, 510-518.
- Nugent, R.L., Johnsson, A., Fleharty, B., Gogol, M., Xue-Franzen, Y., Seidel, C., Wright, A.P., and Forsburg, S.L. (2010). Expression profiling of *S. pombe* acetyltransferase mutants identifies redundant pathways of gene regulation. *BMC genomics* 11, 59.
- Nurse, P. (1996). The central role of a CDK in controlling the fission yeast cell cycle. *Harvey lectures* 92, 55-64.
- Nurse, P. (2012). Finding CDK: linking yeast with humans. *Nature cell biology* 14, 776.
- Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2012). Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *Journal of cell science* 125, 2789-2793.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-128.
- Shahbazian, M.D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual review of biochemistry* 76, 75-100.
- Siino, J.S., Yau, P.M., Imai, B.S., Gatewood, J.M., and Bradbury, E.M. (2003). Effect of DNA length and H4 acetylation on the thermal stability of reconstituted nucleosome particles. *Biochemical and biophysical research communications* 302, 885-891.

- Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T., and Allis, C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1237-1241.
- Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98, 1-4.
- Svejstrup, J.Q. (2004). The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochimica et biophysica acta* 1677, 64-73.
- Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* 14, 1430-1438.
- Wang, J., Tadeo, X., Hou, H., Tu, P.G., Thompson, J., Yates, J.R., 3rd, and Jia, S. (2013). Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes Dev* 27, 1886-1902.
- Wang, Y., Kallgren, S.P., Reddy, B.D., Kuntz, K., Lopez-Maury, L., Thompson, J., Watt, S., Ma, C., Hou, H., Shi, Y., *et al.* (2012). Histone H3 lysine 14 acetylation is required for activation of a DNA damage checkpoint in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 287, 4386-4393.
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., and Bahler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239-1243.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- Wu, P.Y., and Winston, F. (2002). Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Molecular and cellular biology* 22, 5367-5379.
- Yamamoto, M. (1996). Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct Funct* 21, 431-436.
- Zofall, M., Yamanaka, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhang, K., Rubin, C., and Grewal, S.I. (2012). RNA elimination machinery targeting meiotic mRNAs promotes facultative heterochromatin formation. *Science* 335, 96-100.